

# **Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen zur Behandlung von Morbus Alzheimer**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von  
Stefanie Baumann  
Lehramt an Gymnasien (LaG)  
aus Ulm

Berichterstatter: Prof. Boris Schmidt  
Mitberichterstatter: Prof. Harald Kolmar

Tag der Einreichung: 11. September 2009  
Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2009

Darmstadt 2009

**D17**



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt von Dezember 2004 bis September 2008 angefertigt.



## **Danke...**

... an Prof. Dr. B. Schmidt für die Betreuung der Dissertation auf dem spannenden Themengebiet der Medizinalchemie. Sein stetes Interesse und seine hervorragende fachliche Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich auch besonders für die Teilnahme an zahlreichen Tagungsreisen und Forschungsaufenthalten bedanken.

... an den gesamten Arbeitskreis für die angenehme Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima. Insbesondere meinen Laborkollegen Hannes, Gregor, Sumaira, Daniel, Nicole, Andrea, Alex, Diana, Raj und Ali sowie den assoziierten Mitgliedern Felix, Steffen und Verena danke ich für eine stets sehr positive Atmosphäre beim Zusammensein in- und außerhalb der Universität. Ohne euch hätte die Arbeit hier nur halb so viel Spaß gemacht!

... an meine Vertiefungs- und Examensstudenten Diana Kiefer, Heike Ganster und Nicole Vilbrandt für ihren Einsatz und die produktive Zusammenarbeit.

... Nico Kümmerer, Alexandra Esteras, Mayte Theresa Pastor und Luis Serrano für die Unterstützung des Forschungsaufenthaltes und Durchführung eines A $\beta$ -Aggregations- und Toxizitätsassays am EMBL Heidelberg. Prof. Dr. Luciana Marinelli und Dr. Vittorio Limongelli von der Università di Napoli "Federico II" danke ich für die Modellierungstudien für das GSK3-Projekt. Dr. Bruno Bulic für die nette Betreuung am MPI Dortmund in der Arbeitsgruppe von Prof. Waldmann. Den Kollaborationspartnern Dr. Markus Pickhardt am MPI Hamburg danke ich für die Messung der Tau-Daten. Dr. Roland Heyny von Hausen, und Prof. Mall von der Pathologie Darmstadt für die zur Verfügung gestellten Hirnschnitte und die Fluoreszenzmikroskopie.

... Dr. K. Baumann und Robert Schübenel von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, danke ich für die zahlreichen Tests meiner Substanzen in verschiedenen  $\gamma$ -Sekretase-Assays sowie für die Betreuung eines Forschungsaufenthalts.

... an die analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie für die Durchführung und die Hilfe bei der Interpretation von NMR- (Herr Dr. R. Meusinger und Frau Jung) und MS-

Messungen (Frau C. Rudolph und Dr. M. Büchner). Ferner möchte ich Herrn Mahesh Shiorkaar und Frau Dipl.-Ing. Andrea Zall für die Betreuung der HPLC und Durchführung zahlreicher Messungen danken.

... an die DFG sowie der APOPIS Verum Foundation für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

... an Verena, Nicole, Alex und Stefan für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen Anregungen.

... an meine Freunde für die notwendige Ablenkung und die zahlreichen heiteren Momente. Verena für das Einführen in die Darmstädter Lebensart und die lustigen Unternehmungen in die hessische Nachtszene; Daniel für die vielen Gummibärchen, seinen Humor und ehrliche Art; Felix für die zahlreichen Biersitzungen, Selbstversuche und Lachkrämpfe sowie die Rettung aus dem Altrhein; Steffen für die vielen lustigen Abende, allen Kule-Kaffeetrinkern für erheiternde Gespräche; Thomas für die vielen Telefonate und die langjährige Freundschaft.

... meiner Familie für ihre in vielfältiger Form geleistete Unterstützung.

...meinem Partner Stefan für seine Ablenkung, sein Verständnis, seine unvergleichliche Art und großartige Unterstützung.







Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

- B. Schmidt, S. Baumann, R. Narlawar, H. A. Braun, G. Larbig *Neurodegenerative Diseases* **2006**, 3, 290.
- B. Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6, 377.
- S. Baumann, N. Höttecke, B. Schmidt  *$\gamma$ -Secretase as a Target for AD*, in *Medicinal Chemistry of Alzheimer's Disease*, A. Martinez, Ed.; Research Signpost **2008**.
- N. Höttecke, S. Baumann, A. Taghavi, H. A. Braun, B. Schmidt *Drug Development and Diagnostics for Alzheimer's Disease Up to 2008*, in *Frontiers in Medicinal Chemistry*; Vol. 4; Atta-ur-Rahman, A.B. Reitz, Eds.; Bentham Books **2009**, 730-766.
- N. Höttecke, S. Baumann *Bioforum* **2009**, 6, 32.
- S. Baumann, A. Esteras-Chopo, M. T. Pastor, M. Pickhardt, E. Mandelkow, K. Baumann, R. Schübenel, R. Heyny-von Haußen, G. Mall, L. Serrano, B. Schmidt *Biochemistry* **2009**, submitted.
- Stefanie Baumann, Nicole Höttecke, Karlheinz Baumann, Robert Schubnel, Boris Schmidt *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6986.
- Vortrag: 10. Internationale Alzheimer-Konferenz ICAD, Satellitensymposium APOPS: „Tic Taß Tau – A Systematic Approach to Protein Aggregation with Small Molecules“, Madrid, **2006**.
- Kurzvortrag und Posterpräsentation: *3d Summer School Medicinal Chemistry*, Regensburg, **2006**.
- Posterpräsentation: *Neurodegenerative Diseases: Molecular Mechanisms in a Functional Genomics Framework Berlin* **2006**.
- Posterpräsentation: „Tic Taß Tau – A Systematic Approach to Protein Aggregation with Small Molecules“, Jahrestagung der GDCH, Ulm, **2007**.
- Kurzvortrag und Posterpräsentation: Promotionskolloquium TU Darmstadt, „Mapping the Binding Site of  $\gamma$ -Secretase Modulators by Small (and not so Small) Organic Molecules“, Darmstadt, **2008**.



## INHALT

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Etablierte Therapieformen und neue Ansätze	2
1.2 Die molekularen Grundlagen der Alzheimerkrankheit	4
1.2.1 Proteolytische Prozessierung des $\beta$ -Amyloid Vorläuferproteins	6
1.2.2 Bildung von Peptidfibrillen	7
1.3 $\gamma$ -Sekretase als Target zur Behandlung von Morbus Alzheimer	13
1.3.1 Der $\gamma$ -Sekretase-Komplex	14
1.3.2 $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und Modulatoren	17
1.4 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau	28
1.5 Die Rolle von GSK3 in der AD-Pathologie	30
1.5.1 GSK3-Inhibitoren	31
1.6 Alzheimer-Diagnostik	33
<b>2 Zielsetzungen</b>	<b>35</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>37</b>
3.1 Peptidsche $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren	38
3.1.1 Einleitung	38
3.1.2 Synthesen	38
3.1.3 Biologische Aktivität	41
3.2 Semi- und nicht-peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren	43
3.2.1 Thiazolyamide und -amine als $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren	43
3.2.2 Allgemeine Überlegungen und Syntheseplan	44
3.2.3 Synthesen	46
3.2.4 Biologische Aktivität	54
3.2.5 Schlussfolgerung und Ausblick	57
3.3 Modelle der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition	57

3.4	Fenofibrat-abgeleitete $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren	59
3.4.1	Synthese von Fenofibrat-abgeleiteten $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren	60
3.4.2	Ergebnisse	62
3.5	Studien zur Identifizierung der $\gamma$ -Sekretase-Bindungsstelle	66
3.6	Aggregationsinhibitoren	72
3.6.1	Blockierungs- und Auflösungsexperimente mit der A $\beta$ -Hexapeptidsequenz	73
3.6.2	Aggregationshemmung weiterer amyloidogener Peptidsequenzen	75
3.6.3	Hemmung der A $\beta$ <sub>42</sub> -Aggregation	77
3.6.4	Hemmung der Tau-Aggregation	79
3.6.5	Hemmung der A $\beta$ -Sekretion	80
3.6.6	Histologische Studien	82
3.6.7	Diskussion	82
3.7	Fluoreszente PHF-Binder	84
3.8	Potential von GSK3-Inhibitoren in der Alzheimer Therapie	87
3.8.1	Arbeitshypothese	87
3.8.2	Design neuer GSK3-Inhibitoren	87
3.8.3	Synthese von potentiellen GSK3-Inhibitoren	89
3.8.4	Biologische Ergebnisse	91
3.8.4.1	Einfluss auf die A $\beta$ -Aktivität	92
3.8.4.2	Einfluss auf die Tau-Phosphorylierung	93
3.8.5	Zusammenfassung und Ausblick	95
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>99</b>
5.1	Allgemeine Anmerkungen	99
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	100
5.3	Synthesen	106
5.3.1	Peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren	106
5.3.2	Semi-peptidische und nicht-peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren	111
5.3.3	Synthese der Pyridinylharnstoffe	129
5.3.4	Synthese der Pyridinylthioharnstoffe	135
5.3.5	Synthese der Aggregationsinhibitoren	140

5.3.6	Synthese des Diazirin-Photolabels	143
5.3.7	Synthese von Fenofibrat-abgeleiteten GSMs	150
5.4	Assays	164
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>179</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimerkrankheit
AD2	Antikörper, der die Ser396-und Ser404 Phosphorylierung von Tau erkennt
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADME	<i>absorption, distribution, metabolism, excretion</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
Aph-1	<i>anterior pharynx defective-1</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Ar	Aromat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	<i><math>\beta</math>-site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
clogP	berechneter dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
COX	Cyclooxygenase
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>
CTF	C-terminale Fragmente
Cy	Cyclohexan
d	Dublett
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPT	(2-(2-(3,5-Difluorphenyl)acetoxy)-propionylamino)-phenyllessigsäure- <i>tert</i> -butylester
DC	Dünnschichtchromatographie
DC <sub>50</sub>	effektive Konzentration mit 50% des Maximaleffektes

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMPK	<i>drug metabolism and pharmacokinetics</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDAC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid·HCl
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoßionisation
Elan	Elan Pharmaceuticals, Inc.
EM	Elektronenmikroskop
equiv	Äquivalent
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB-4	<i>V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4</i>
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
FAD	<i>familiar alzheimer disease</i>
FTDP-17	<i>frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
ges.	gesättigt
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GSM	$\gamma$ -Sekretase-Inhibitor
GSI	$\gamma$ -Sekretase-Modulator
h	Stunde(n)
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol·H <sub>2</sub> O
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC <sub>50</sub>	Konzentration, die eine 50%ige Hemmung bewirkt
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch

$K_i$	Dissoziationskonstante
konz.	konzentriert
$K_D$	Dissoziationskonstante
KOt-Bu	Kalium- <i>tert</i> -butylat
LDL	low density lipoprotein
LDH	Lactatdehydrogenase
LC	<i>liquid chromatography</i>
LPECL	<i>A<math>\beta</math> liquid phase electrochemiluminescence</i>
m	Multiplett
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MSD	Merck Sharp & Dohme
$m/z$	Masse/Ladung
MCPBA	3-Chlorperbenzoesäure
MS	Massenspektrometrie
MSD	Merck Sharp & Dome
n. a.	nicht aktiv
n. b.	nicht bestimmt
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>
Nic	Nicestrin
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NSAIDs	<i>nonsteroidal antiinflammatory drugs</i>
NTF	N-terminale Fragmente
PEN-2	<i>presenilin enhancer-2</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	<i>paired helical filaments</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
Ph	Phenyl
PLD1	Phospholipase D1
PPAR- $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math></i>
Pr	Propyl
PrP <sup>Sc</sup>	Prion Protein Scrapie



PS	Presenilin
PSEN	Bezeichnung für die Presenilin-Gene
py	Pyridin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorphosphat
PyBroP	Bromtripyrrolidinphosphoniumhexafluorphosphat
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
RCDS	<i>redox chemical delivery system</i>
Ref.	Referenz
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
Rock	Rho-assoziierte Kinase
r.t.	Raumtemperatur
s	Singulett
SAR	<i>structure-activity relationship</i>
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i>
SPP	Signal-Peptid-Peptidase
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TACE	<i>tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i>
TDZD	Thiadiazolidinone
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
ThS	Thioflavin-S
ThT	Thioflavin-T
TM	Transmembrandomäne
TMS	Tetramethylsilan
TMP21	Transmembranprotein 21
tPSA	<i>topological polar surface area</i>
X	Halogen
Z	Benzyloxycarbonyl
ZNS	Zentrales Nervensystem
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge



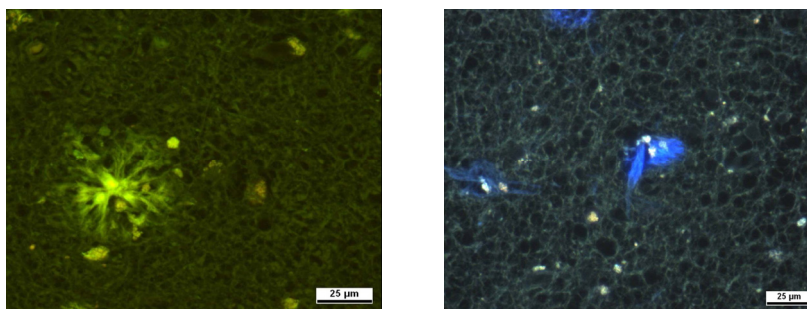
## 1. Einleitung

Die Alzheimerkrankheit (AD) ist heute weltweit die häufigste Form von Demenz.<sup>[1]</sup> 1906 brachte Alois Alzheimer erstmalig die klinischen Symptome der Krankheit, wie z.B. Gedächtnisverlust, Verwirrung, Depression sowie starken Persönlichkeitsveränderungen mit neurofibrillärer Pathologie im Gehirn seiner 51-jährigen Patientin, Auguste D. in Verbindung.<sup>[2]</sup> Weltweit sind schätzungsweise 15 Millionen Menschen betroffen und die Zahl der an AD erkrankten Patienten erhöht sich mit steigender Lebenserwartung.

Der beobachtete neuronale Zellverlust wird von extrazellulären Plaques aus Amyloid  $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ) und intrazellulären Neurofibrillen (*neurofibrillary tangles*, NFTs) begleitet. Beide Ablagerungen werden *post mortem* in Gehirnen von Alzheimerpatienten nachgewiesen (Abb. 1) und bilden auch heute noch die Grundlage für die Diagnose.<sup>[1, 3]</sup> Voraussetzung für eine erfolgreiche Kausaltherapie ist demnach das detaillierte Verständnis dieser Plaque- und NFT-Bildung.

Die  $A\beta$ -Peptide werden durch die zwei Aspartylproteasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase vom  $\beta$ -Amyloid Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) generiert. Beide Sekretasen haben mehrere Substrate und verursachen unterschiedliche Spaltungen des APP. Für gewöhnlich werden 90% des APP von der  $\alpha$ -Sekretase abgebaut und nur 10% von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase, was in der Bildung von extrazellulärem  $A\beta$  resultiert. Zum aktuellen Zeitpunkt sind weder die pathologischen Folgen des abgelagerten oder löslichen  $A\beta$  eindeutig geklärt, noch korreliert die Plaquebildung nachweislich mit dem Fortschreiten der AD.

Bei den NFTs handelt es sich um intrazelluläre Anhäufungen abnormer Filamente in den Nervenzellen. Hauptbestandteil ist das in pathologischer Weise veränderte Tau-Protein, ein neuronales mikrotubuli-assoziiertes Protein.<sup>[4, 5]</sup> Dieses veränderte Tau ist stark phosphoryliert und teilweise fragmentiert.



**Abb. 1:** links: Gehirnschnitt eines Alzheimerpatienten mit angefärbtem Plaque, rechts: Gehirnschnitt mit abgefärbtem NFT. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hirnschnitten, angefärbt mit Methoxy-XO4 (links) und BSc3594 (rechts), Klinikum Darmstadt

Ausgehend von der Identifizierung dieser proteinhaltigen Ablagerungen wurde die Hypothese der  $\beta$ -Amyloid-Toxizität abgeleitet: Danach ist die Bildung bzw. Ablagerung von A $\beta$  über eine komplexe pathologische Kaskade mit der Entstehung der Neurofibrillen verbunden, die letztendlich zum Tod der Nervenzellen führt und somit das klinische Bild einer AD begründet.<sup>[6]</sup>

Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die ursprünglich für ihre Rolle bei der Regulation des Glykogen-Metabolismus identifiziert wurde. Abgesehen davon, dass sie in der Insulin-vermittelten Signaltransduktion involviert ist, wird sie stark im Gehirn exprimiert und viele Hinweise deuten darauf hin, dass GSK3 mit der Tau-Phosphorylierung, der A $\beta$ -Bildung sowie der A $\beta$ -induzierten Neurotoxizität in Verbindung steht. Dies lässt vermuten, dass GSK3 eine Hauptrolle bei der Pathogenese der AD spielt.

Ein potentieller Ansatz für eine Kausaltherapie von AD ist die Verhinderung der Plaque- und NFT-Bildung. Substanzen, die dies bewirken können, sind die Inhibitoren der A $\beta$ -generierenden Enzyme ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase), A $\beta$ - und Tau-Aggregationshemmer sowie Inhibitoren der GSK3.

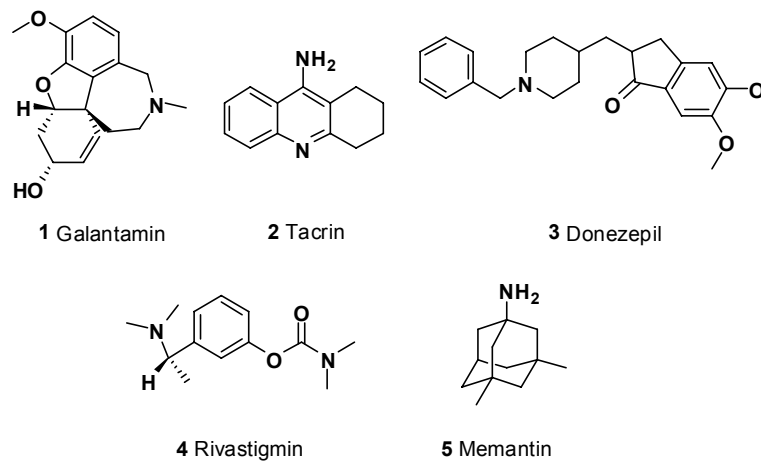
### 1.1 Etablierte Therapieformen und neue Ansätze

Bedingt durch die Vielzahl an beteiligten Rezeptoren und Enzymen leiten sich zur Behandlung von AD unterschiedliche Therapieformen ab. Inhibitoren der Acetylcholinesterase, Antagonisten des *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor), Serotonin-Agonisten sowie entzündungshemmende Mittel wie Inhibitoren der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) befinden sich in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien.

Beispiele zugelassener Medikamente sind Galantamin (1), Tacrin (2), Donepezil (3) und Rivastigmin (4) (Abb. 2). Hierbei handelt sich um Acetylcholinesterase-Hemmer mit verschiedenen, teilweise starken Nebenwirkungen. Diese Inhibitoren verlängern im Gehirn die Halbwertszeit von Acetylcholin und bewirken dadurch eine Erhöhung der in Gehirnen von Alzheimerpatienten niedrigen Acetylcholin-Konzentration. Diese Wirkstoffe führen lediglich zu geringfügigen Verbesserungen der kognitiven Fähigkeiten bei Patienten im frühen Stadium.<sup>[7-9]</sup>

Memantin (5), ein NMDA-Rezeptor-Antagonist, greift in das glutamatergene System ein. Glutamat ist ein Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS), dessen Konzentration bei AD verändert ist. Memantin blockiert die schädliche Glutamatwirkung, die zu

Funktionseinschränkungen und schließlich zum Absterben von Nervenzellen führt.<sup>[10]</sup> Neben den genannten Präparaten existieren zahlreiche Medikamente wie Gingko und Calciumantagonisten, deren physiologische Wirksamkeit bisher nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 2:** Medikamente zur Symptombehandlung von AD

Eine von Elan/Wyeth durchgeführte Impfung gegen Alzheimer zeigte in Tierversuchen an transgenen Mäusen vielversprechende Ergebnisse. Die Impfstoffe richten sich gegen das A $\beta$ -Peptid und regen die Bildung von Antikörpern an. Der Impfstoff AN-1792, ein synthetisches A $\beta_{42}$ -Peptid, verhindert die Bildung der Plaques im Gehirn junger Tiere und reduziert das Fortschreiten der Plaquebildung und der damit verbundenen neuropathologischen Effekte bei älteren Mäusen.<sup>[11]</sup> Die klinische Studie wurde allerdings abgebrochen, da es bei vier Patienten zu Entzündungen des Zentralnervensystems kam.<sup>[12]</sup> Weiterentwickelte Impfstoffe, die diese Autoimmunantwort vermeiden sollen, befinden sich momentan in fortgeschrittenen Entwicklungsphasen.

Bei *in vivo* Untersuchungen von Statinen, einer Klasse von cholesterinsenkenden Wirkstoffen zeigte sich eine Reduktion der A $\beta$ -Produktion..<sup>[13-15]</sup> Da das Gehirn Cholesterin nicht durch zirkulierende Plasmalipoproteine aufnimmt, gelangen nur kleine Mengen von exogenem Cholesterin zu den Neuronen; das meiste wird *de novo* gebildet. Statine hemmen diese Synthese und die A $\beta$ -Sekretion sinkt.<sup>[16]</sup> Jedoch ist inzwischen bekannt, dass Statine in prospektiven klinischen Studien wirkungslos sind.

Interessanter sind daher die entzündungshemmende Medikamente, so genannte *nonsteroidal antiinflammatory drugs* (NSAIDs). Untersuchungen ergaben, dass das Alzheimerisiko von Personen, die NSAIDs einnehmen, erheblich geringer ist als das von Kontrollpersonen.<sup>[17]</sup> Allerdings stehen diese Verbindungen im Verdacht, kardiovaskuläre Probleme hervorrufen zu

können, wenn sie auf Dauer und in den für eine Alzheimerbehandlung erforderlichen hohen Dosen eingenommen werden. Ihre positive Wirkung für Alzheimerpatienten liegt in einer direkten Beeinflussung der Spaltung des APP.<sup>[18, 19]</sup>

Keine der vorgestellten Therapien kann bisher den Verlauf der AD aufhalten oder heilen. Umso wichtiger sind daher sowohl das Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Grundlagen als auch die Entwicklung einer Kausaltherapie.

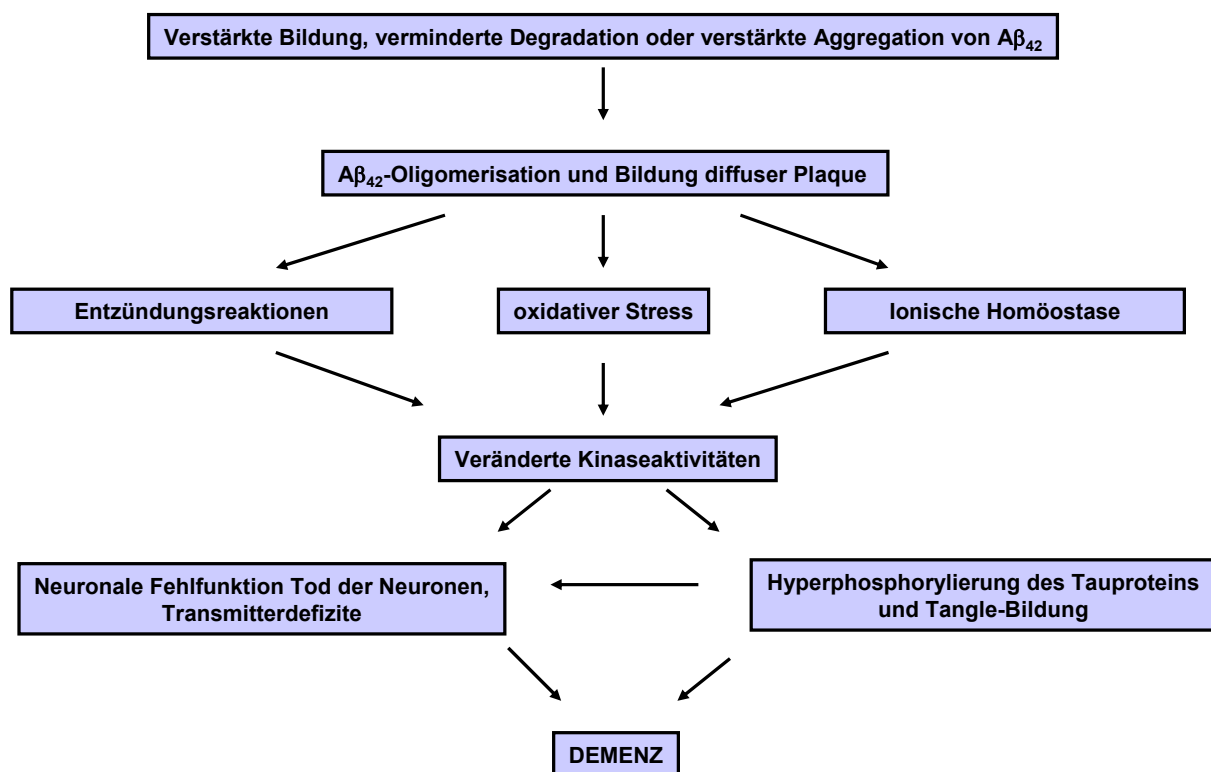
## 1.2 Die molekularen und genetischen Grundlagen der Alzheimerkrankheit

Aspartylproteasen katalysieren die Bildung amyloidogener Peptide, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der AD spielen. Die Plaques bestehen überwiegend aus den A $\beta$ <sub>40</sub>- und A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptiden.<sup>[20-24]</sup> Zudem sind weitere Proteinkomponenten, wie z.B. die Apolipoproteine E (ApoE) und J,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, sowie Proteoglykane in Plaques nachweisbar (zur Übersicht: s. Ref. <sup>[25]</sup>).

Obwohl sich die Länge der beiden Hauptkomponenten der Amyloid-Plaques nur um zwei Aminosäuren (AS) unterscheidet, sind die chemischen Eigenschaften grundlegend verschieden. Die Lipophilie des A $\beta$ <sub>42</sub> ist durch die beiden zusätzlichen AS Ile und Ala erhöht und A $\beta$ <sub>42</sub> zeigt *in vitro* eine deutlich höhere Aggregationsbereitschaft als A $\beta$ <sub>40</sub>.<sup>[26]</sup> Zudem ist das in senilen Plaques konzentrierte A $\beta$ <sub>42</sub> widerstandsfähiger gegen abbauende Enzyme als die übrigen A $\beta$ -Spezies.<sup>[27]</sup>

Der größte Anteil der Alzheimererkrankungen ist sporadischer Herkunft, nur 5–10% sind auf genetische Mutationen familiärer Art (FAD) zurückzuführen.<sup>[20]</sup> In wenigstens vier Chromosomen (1, 14, 19, 21) konnten Mutationen oder Polymorphismen einiger Gene identifiziert werden, die an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind. Mutationen in drei dieser Gene (Presenilin 2<sup>[28]</sup> auf Chromosom 1, Presenilin 1<sup>[28]</sup> auf Chromosom 14, APP<sup>[29]</sup> auf Chromosom 21) verursachen mit nahezu 100%iger Wahrscheinlichkeit AD. Weiterhin stellt das  $\epsilon$ 4-Allel von ApoE ein bedeutendes, 16-mal höheres Risiko dar, an AD zu erkranken. Autosomal-dominant vererbte Formen der Alzheimerkrankheit sind durch einen Krankheitsausbruch im mittleren (40–50 Jahre) oder frühen (20–30 Jahre) Lebensalter gekennzeichnet, können aber histopathologisch nicht von den sporadisch auftretenden Fällen der AD unterschieden werden.<sup>[1, 26]</sup> Auffällig ist, dass alle bisher bekannten Mutationen in den Genen für APP, Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) entweder zu einer Erhöhung der A $\beta$ -Sekretion insgesamt oder aber meist spezifisch zu einer verstärkten Sekretion des A $\beta$ <sub>42</sub> führen.<sup>[20]</sup>

Derzeit wird davon ausgegangen, dass weder monomere Formen des A $\beta$ -Peptids, noch unlösliche fibrilläre Aggregate die eigentliche Zytotoxizität bedingen, sondern vielmehr lösliche Oligomere für die Fehlfunktion der Synapsen und die Neurotoxizität verantwortlich sind.<sup>[30]</sup> Der für die Neuronen toxische Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Zahlreiche experimentelle Befunde unterstützen jedoch die so genannte Amyloid-Hypothese, wonach die extrazelluläre Aggregation der A $\beta$ -Peptide am Anfang einer Kaskade steht, die letztlich zum Absterben der Neuronen führt (Abb. 3).<sup>[31]</sup>



**Abb. 3:** Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloid-Kaskade (Quellen: [31-33])

Die Aggregation der A $\beta$ -Peptide führt direkt bzw. indirekt zu einer Schädigung der Neuronen und bedingt eine Änderung des intrazellulären Milieus. Die dabei veränderten Kinase- und Phosphataseaktivitäten führen unter anderem zur Entstehung von NFTs und somit zu einem Funktionsverlust und dem Tod von Neuronen, was als unmittelbare Ursache für die Demenz angesehen wird.<sup>[1, 21, 31]</sup>

### 1.2.1 Proteolytische Prozessierung des $\beta$ -Amyloid Vorläuferproteins

APP ist ein glykosyliertes Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne. N-terminal befindet sich ein 17 AS langes Signalpeptid, das für die Translation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) benötigt wird.<sup>[34, 35]</sup>

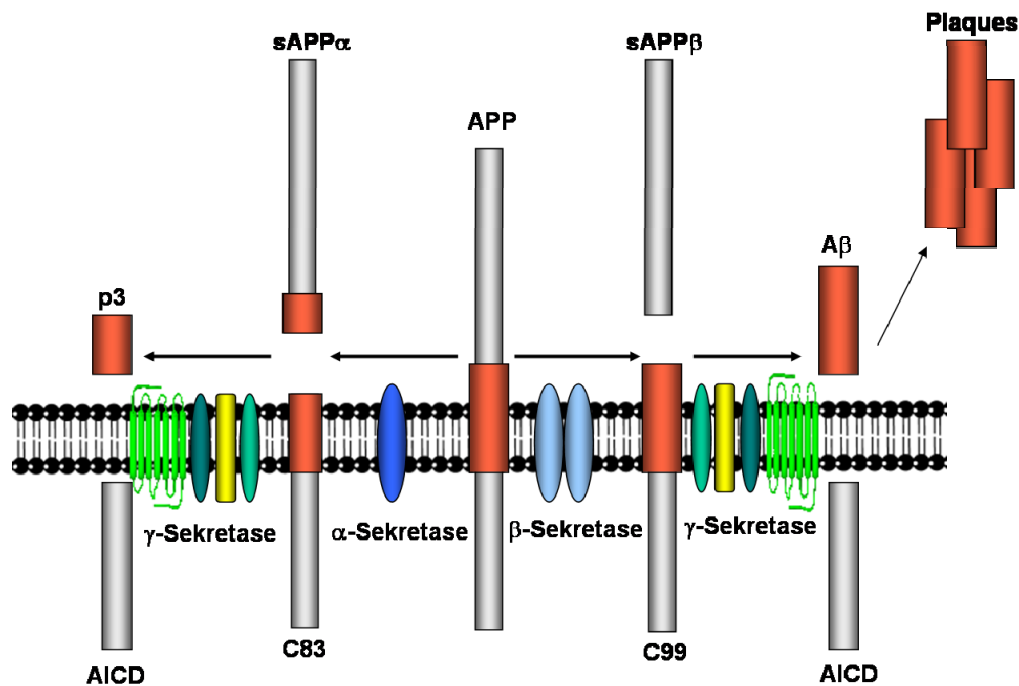
APP wird in nahezu allen Zelltypen und Geweben exprimiert.<sup>[36]</sup> Es werden hauptsächlich drei Isoformen des Proteins, die aus 695, 751 oder 770 AS bestehen, unterschieden. Die kürzeste Form, APP<sub>695</sub>, wird fast ausschließlich in Neuronen exprimiert, während APP<sub>751</sub> die häufigste Isoform in nicht neuronalen Zellen ist.<sup>[37]</sup> Die physiologische Funktion von APP ist nicht abschließend geklärt, auch wenn zahlreiche mögliche Funktionen in verschiedensten physiologischen Prozessen impliziert wurden.<sup>[26]</sup> Für APP<sub>751</sub> und APP<sub>770</sub> wird eine gerinnungshemmende Funktion angenommen.<sup>[38]</sup> Ferner werden Funktionen in der Zell-Zell-Interaktion, der Zelladhäsion, der Signaltransduktion und dem Zellwachstum, insbesondere dem Auswachsen von Neuriten, diskutiert.<sup>[39, 40]</sup>

APP kann auf seinem sekretorischen Transportweg durch verschiedene Proteasen, der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase, proteolytisch gespalten werden (Abb. 4).<sup>[20]</sup> Dabei werden zwei Prozessierungswege unterschieden: Der amyloidogene Weg, bei dem das A $\beta$ -Protein freigesetzt werden kann, sowie der nicht-amyloidogene Weg, bei dem die Entstehung des A $\beta$ -Proteins durch einen proteolytischen Schnitt in der A $\beta$ -Region verhindert wird.

Der größte Anteil von APP wird zunächst durch die  $\alpha$ -Sekretase, Vertreter der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Familie, prozessiert. Hierbei wird die Ektodomäne als lösliches Molekül sezerniert (sAPP $\alpha$ ). Der in der Membran verbleibende, 83 AS lange C-terminale Rest (C83) wird anschließend durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, wobei eine intrazelluläre Domäne (APP intracellular domain, AICD)<sup>[41]</sup> und ein lösliches, 3 kDa schweres Peptid (p3) freigesetzt werden.<sup>[42]</sup>

A $\beta$  entsteht, wenn APP alternativ über die  $\beta$ -Sekretase gefolgt von der  $\gamma$ -Sekretase prozessiert wird. Der erste Schnitt durch die  $\beta$ -Sekretase lässt das Protein C99 an der Membran zurück und es entsteht eine kürzere lösliche Ektodomäne (sAPP $\beta$ ). Die  $\gamma$ -Sekretase generiert nun durch einen weiteren Schnitt im Transmembranbereich von C99 A $\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge.<sup>[20, 41, 43, 44]</sup>





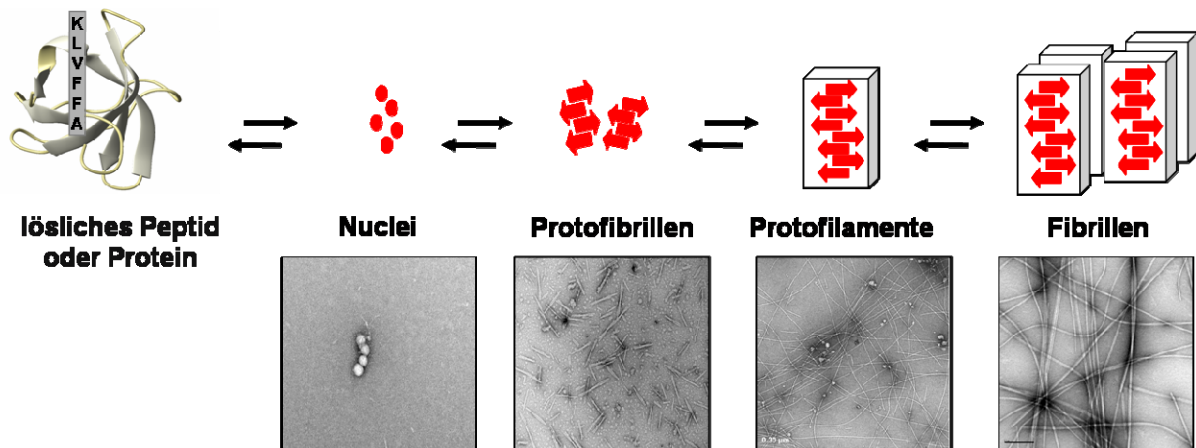
**Abb. 4:** Proteolytische Prozessierung von APP durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase

Interessanterweise liegen alle bisher bekannten FAD-Mutationen des APP-Gens in der Nähe der Schnittstellen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Die schwedische Doppelmutation K595N/M596L wurde in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen.<sup>[45]</sup> Diese Mutation erhöht die Affinität der  $\beta$ -Sekretase zu ihrem Substrat und es entsteht vermehrt A $\beta$ -Peptid.<sup>[46-48]</sup>

### 1.2.2 Bildung von Peptidfibrillen

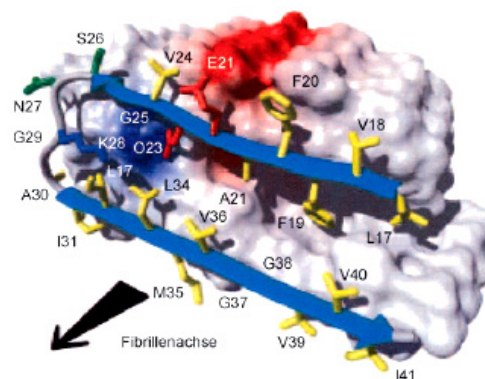
Nach heutigem Stand der Wissenschaft ist die Polymerisierung des löslichen A $\beta$ -Peptids oder dem Tau-Protein zu hoch geordneten Fibrillen ein ursächliches Ereignis bei der Entstehung von AD. Die Bildung von Peptidfibrillen ist aber symptomatisch für alle sogenannten Amyloidose-Krankheiten wie Parkinson oder Creutzfeldt-Jacob.<sup>[49-51]</sup>

Amyloidfibrillen enthalten Bündel aus  $\beta$ -Faltblatteinheiten, in denen das Proteingerüst senkrecht zur Fibrillenachse orientiert ist.<sup>[52]</sup> Die  $\beta$ -Faltblatteinheiten bilden in Selbstorganisation Protofilamente, die sich anschließend zu Fibrillen zusammenlagern.<sup>[50]</sup> Abb. 5 zeigt den Prozess der Fibrillenbildung der Hexapeptidsequenz KLVFFA.



**Abb. 5:** Prozess der Fibrillenbildung. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hexapeptidsequenz KLVFFA, EMBL Heidelberg

Mittels Infrarotspektroskopie wurde nachgewiesen, dass sich die  $\beta$ -Faltblatteinheiten in den Fibrillen antiparallel anordnen. Abb. 6 zeigt die  $\beta$ -Strang-Turn- $\beta$ -Strangkongformation von  $A\beta_{18-42}$  ( $AS_{1-17}$  sind ungeordnet).



**Abb. 6:** Aus H/D-Austausch-NMR-Spektroskopie erhaltene Kongformation von  $A\beta_{17-42}$ . Die Farben gelb, grün, rot und blau kennzeichnen hydrophobe, polare, negativ geladene bzw. positiv geladene Aminosäuren. Positiv oder negativ geladene Oberflächenabschnitte sind in blau bzw. rot gekennzeichnet. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [53]

Man nimmt an, dass für den Aufbau von Fibrillen sowohl hydrophobe Wechselwirkungen als auch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung zwischen Phenylalaninresten sowie Tyrosin-Tyrosin-Wechselwirkungen entscheidend sind.<sup>[54]</sup> Kürzlich wurde untersucht, ob die Bildung von Fibrillen aus partiell gefalteten oder denaturierten Intermediaten erfolgt. Die Fibrillenbildung des Prion-Protein Scrapie ( $PrP^{Sc}$ ) wird durch Bedingungen begünstigt, die zu einer teilweisen Entfaltung führen.<sup>[55]</sup> Das Ausmaß der Entfaltung und die Morphologie der Fibrillen hängt demnach vom Grad der Denaturierung ab.<sup>[56]</sup>

Hou *et al.* untersuchten A $\beta$ <sub>40</sub>- und A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptide, in denen die Methioninseitenkette (Rest 35) reduziert oder oxidiert war. Mit NMR-Messungen in Lösung konnten Wechselwirkungen zwischen bestimmten Aminosäureresten in den ersten Phasen der Aggregation nachgewiesen werden.<sup>[57]</sup> Die Befunde lassen darauf schließen, dass für die ersten Schritte der Aggregation sowohl hydrophobe als auch schleifenförmige Strukturen erforderlich sind. Mit NMR-Experimenten in Lösung wurde die Region in A $\beta$ <sub>40</sub> identifiziert, die für Kontakte zwischen den Fibrillen relevant ist: Dabei handelt es sich um die Sequenz A $\beta$ <sub>15–24</sub>. Die NMR-spektroskopischen Daten belegen auch, dass bei physiologischen Salzkonzentrationen ein löslicher Monomierzustand mit einem aggregierten Oligomierzustand im Gleichgewicht steht, wobei die Lage des Gleichgewichts durch eine Änderung der Anionenstärke verschoben werden kann. Das Molekulargewicht des Oligomers betrug mehr als 100 kDa.<sup>[58]</sup>

Die Fibrillenbildung ist ein mehrstufiger Prozess und die zunächst gebildeten Aggregate ohne Fibrillenstruktur können auch wieder zerfallen.<sup>[59]</sup> Die Bildung der Fibrillen setzt üblicherweise nach einer zeitlichen Verzögerung ein, was auf einen Keimbildungs- und Wachstumsprozess schließen lässt.<sup>[51, 56]</sup> Gibt man zuvor hergestellte Aggregate als Keime zu (*seeding*), tritt keine Verzögerung auf.<sup>[60]</sup> Für die Wachstumsphase der Fibrillenbildung belegen ältere Untersuchungen an A $\beta$ <sub>40</sub> eine Kinetik erster Ordnung, d.h. die Geschwindigkeit der Fibrillenverlängerung ist zur Konzentration der Monomere proportional. Dies ergaben Lichtstreuungsmessungen an A $\beta$ <sub>40</sub> in 0.1 M HCl,<sup>[61]</sup> *in vitro*-Untersuchungen der Plaques in Hirngewebe von Alzheimer-Patienten<sup>[62]</sup> und Thioflavin-T(ThT)-Fluoreszenz-Untersuchungen.<sup>[63]</sup> Die Temperaturabhängigkeit der Aggregation von A $\beta$ <sub>40</sub> folgt der Arrhenius-Beziehung; der Wert der Aktivierungsenergie beträgt 96 kJmol<sup>-1</sup> und ist vergleichbar mit Werten, die für die Entfaltung einiger anderer Peptide gefunden wurden.<sup>[64]</sup>

Zwei Arbeitsgruppen untersuchten die Kinetik der Fibrillenbildung des Hefe-Prionenproteins Sup35.<sup>[65, 66]</sup> Für die Wachstumskinetik nach der Zugabe von Keimen wurde ein dreistufiges Modell vorgeschlagen, welches die Keimbildung, die schrittweise Addition von Monomeren sowie die Fragmentierung von Fibrillen einbezieht.<sup>[65]</sup> Neben dem Aufbau der Fibrillen durch die Addition von Monomeren gibt es demnach einen konkurrierenden Prozess der Disaggregation.

Die Präparationsbedingungen, besonders der Einsatz von Ultraschall, beeinflussen die Morphologie der Fibrillen und die Toxizität.<sup>[67]</sup> Die Geschwindigkeit der Aggregation beeinflusst die Länge der Fibrillen: Eine schnelle Aggregation führt zu kurzen Fibrillen, während sich unter Bedingungen, die ein langsames Wachstum begünstigen, längere Fibrillen bilden.<sup>[68]</sup>

Man geht heute davon aus, dass Oligomere bzw. die Protofibrillen, die sich am Beginn der Selbstorganisation bilden, die eigentlichen toxischen Spezies sind.<sup>[49, 69-73]</sup> Die Bildung von A $\beta$ -Oligomeren läuft intrazellulär ab, wie *in vivo*-Untersuchungen mit humaner Cerebrospinalflüssigkeit ergaben.<sup>[74]</sup> Aktuelle Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Akkumulierung von A $\beta$  in den Endosomen stattfindet, wo die Spaltung durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase erfolgt.<sup>[75]</sup>

*In vivo*- und Zellkultur-Experimente ergaben, dass A $\beta_{42}$ -Oligomere eine neurotoxische Wirkung aufweisen.<sup>[76-78]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass besonders Dimere und Trimere Lernprozesse bei Ratten verhindern.<sup>[79]</sup> Aus Immunglobulin isolierte Anti-A $\beta$ -Antikörper unterdrücken die Fibrillenbildung vollständig.<sup>[80]</sup> Experimenten mit polyklonalen Antikörpern zufolge wird die Toxizität von löslichen Oligomeren durch Antikörper unterdrückt, während fertige Fibrillen keine Antikörperreaktion zeigen.<sup>[81]</sup> Experimente mit A $\beta$ ,  $\alpha$ -Synuclein und Transthyretin lassen darauf schließen, dass ihre zytotoxische Wirkung eine gemeinsame Ursache hat, die nicht von der jeweiligen Aminosäuresequenz abhängt.<sup>[69]</sup> *In vivo*-Untersuchungen an Mäusen weisen darauf hin, dass der Gedächtnisverlust bei AD mit bestimmten löslichen A $\beta$ -Multimeren, z.B. dem Dodecamer mit einem Molekulargewicht von 56 kDa, zusammenhängt.<sup>[82]</sup> Die Zytotoxizität könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass mehrere amyloidbildende Proteine Poren oder Kanäle in Membranen bilden.<sup>[71, 83, 84]</sup> Eine Ursache könnte die offene Lage von hydrophoben Regionen in fehlgefalteten Proteinen sein, eine andere Rolle könnten positive Ladungen in Peptiden spielen, die zu Wechselwirkungen mit negativ geladenen Lipidmembranen führen.<sup>[83]</sup> Lambert *et al.* demonstrierten, dass A $\beta_{42}$ -Oligomere an Zellmembranen binden und unter Bedingungen, bei denen sich keine ausgereiften Fibrillen bilden, eine zytotoxische Wirkung ausüben.<sup>[76]</sup> Auch die Beobachtung, dass die Porenbildung durch die Bindung von Kongorot unterdrückt wird,<sup>[85]</sup> weist darauf hin, dass A $\beta$  zu Protofilamenten aggregiert. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen belegen, dass A $\beta$  in Lipidmembranen Poren bildet, die Multimere des Proteins enthalten. Durch diese Ionenkanäle können vermehrt Calcium-Ionen aufgenommen werden, die zur Nervendegeneration und letztlich zum Zelltod führen.<sup>[86]</sup>

Die Beobachtung, dass Protofilamente eine größere toxische Wirkung haben als fertige Fibrillen, trifft auch auf das Tau-Protein zu.<sup>[49]</sup> Filamentablagerungen aus Tau-Protein treten bei den so genannten Tauopathien wie Morbus Pick oder der Parkinson-Krankheit auf. Dabei treten keine Ablagerungen von A $\beta$  auf. Die genaue Wechselwirkung zwischen A $\beta$  und Tau bei der Fibrillenbildung ist bisher nicht geklärt, es scheint aber ein synergistischer Effekt vorzuliegen, der die Aktinbündelung und die Neurodegeneration verstärkt.<sup>[49]</sup>

Verschiedene Experimente liefern Belege dafür, dass die Bildung von Amyloidfibrillen eine gemeinsame Eigenschaft vieler, wenn nicht aller Proteine ist: Zum einen kann die Bildung von Fibrillen durch die partielle Denaturierung von Proteinen induziert werden, die nichts mit einer Krankheit zu tun haben;<sup>[87]</sup> auch *de novo* erzeugte Peptidfragmente können Fibrillen bilden. Zum anderen kann die Amyloidbildung durch Zugabe von Fibrillenbildungskeimen induziert werden, die von dem gleichen, einem ähnlichen oder einem ganz anderen Protein stammen.<sup>[56, 88, 89]</sup> Dieser Prozess könnte bei der Übertragung von Prionenkrankheiten eine Rolle spielen.<sup>[88]</sup> Allerdings könnten an der Übertragung von spongiformen Encephalopathien auch zusätzliche Cofaktoren beteiligt sein. Kleine Peptidfragmente können die Fibrillenbildung inhibieren; z.B. lässt sich die Fibrillenbildung von A $\beta$ <sub>40</sub> durch Fragmente inhibieren, die A $\beta$ <sub>40</sub>-homologe Sequenzen enthalten.<sup>[90]</sup>

Vor kurzem wurden mutierte Formen von A $\beta$ <sub>42</sub> hergestellt, in denen hydrophobe Reste der C-terminalen Hälfte durch zufällige unpolare Reste ersetzt wurden. Es zeigte sich, dass die Fibrillenbildung davon nicht beeinflusst wurde. Offenbar sind beliebige hydrophobe Sequenzen für die Fibrillenbildung von A $\beta$ <sub>42</sub> ausreichend.<sup>[91]</sup>

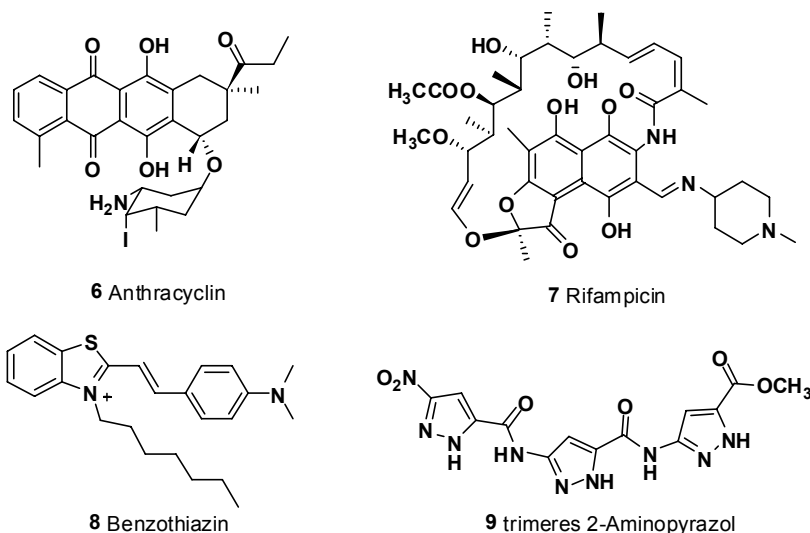
Aktuelle Untersuchungen konzentrieren sich auf die Bestimmung der kürzesten Peptidsequenz, die zur Bildung von Amyloidfibrillen führen kann. Für das Tau-Protein wurde VYK als minimale Kernsequenz bestimmt.<sup>[92]</sup> Hilbich *et al.* zeigten, dass eine Region im hydrophoben Kern von A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> um die Reste 17 bis 20 (d.h. LVFF) für die Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausschlaggebend ist.<sup>[93]</sup> Tjernberg *et al.* untersuchten die Bindung von A $\beta$ <sub>40</sub>-Fragmenten und modifizierten A $\beta$ <sub>40</sub>-Fragmenten an das vollständige Peptid.<sup>[94]</sup> Die Bindung von <sup>125</sup>I-markierten A $\beta$ <sub>40</sub>-Peptiden wurde mit Autoradiographie untersucht. Dabei wurden A $\beta$ <sub>40</sub>-Fragmente mit drei bis zehn Resten hergestellt. Nur Pentapeptide oder längere Fragmente wiesen eine signifikante Bindung an A $\beta$ <sub>40</sub> auf, wobei in allen stark bindenden Sequenzen das Fragment A $\beta$ <sub>16-20</sub> (d.h. KLVFF) enthalten war.<sup>[95]</sup> Die Untersuchung verschiedener Varianten des Pentapeptids KLVFF mit substituierten Aminosäuren ergab, dass die Reste 2, 3 und 5 (K,L,F) am wichtigsten für die Bindung dieses Fragments an A $\beta$ <sub>40</sub> sind. Findeis *et al.* untersuchten die Hemmung der A $\beta$ -Fibrillenbildung durch A $\beta$ -Fragmente.<sup>[96]</sup> Auch diese Untersuchung bestätigte die Bedeutung der A $\beta$ <sub>16-21</sub>-Region.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass A $\beta$ <sub>14-23</sub> die kürzeste Peptidsequenz ist, aus der sich Fibrillen bilden. Das KLVFF-Peptid allein bildet keine Fibrillen. Meredith und Mitarbeiter untersuchten später Varianten von KLVFF<sup>[97]</sup> und KLVFFAE,<sup>[98]</sup> in denen bei jedem zweiten Rest Amidprotonen durch *N*-Methylgruppen ersetzt wurden. Für

Ac-K(Me)LV(Me)FFNH<sub>2</sub> wurde die Bildung von ausgedehnten  $\beta$ -Strängen beobachtet.<sup>[97]</sup> Dieses Peptid weist außerdem eine höhere Wasserlöslichkeit als KLVFF auf und es kann Membranen von Phospholipidvesikeln und Zellen durchdringen. Es kann weder durch Lösungsmittelzugabe noch Temperatur- oder pH-Wert-Erhöhung denaturiert werden. TEM-Untersuchungen des KLVFF-Fragments in phosphatgepufferten Kochsalzlösungen deuten darauf hin, dass dieses Fragment selbst Fibrillen bildet. In einer weiteren Untersuchung wurde die Bildung von Fibrillen aus dem Heptapeptid A $\beta$ <sub>16–22</sub> (d. h. (CH<sub>3</sub>CO)KLVFFAE(NH<sub>2</sub>)) beschrieben.<sup>[99]</sup>

Computersimulationen, die auf Berechnungen von Konfigurationsverteilungen von  $\beta$ -Faltblattpeptiden beruhen, sagen voraus, dass A $\beta$ <sub>17–21</sub> zur Aggregation in  $\beta$ -Faltblattstrukturen tendiert.<sup>[70, 100]</sup> Auch Rechnungen auf der Basis der Aggregationseigenschaften der konstituierenden Aminosäuren sagen vorher, dass diese Region von A $\beta$ <sub>42</sub> zur Aggregation neigt.<sup>[101]</sup> Auf der Grundlage ähnlicher Untersuchungen schlugen Kallberg *et al.* vor, dass A $\beta$ <sub>16–23</sub> eine sogenannte diskordante Aminosäuresequenz ist,<sup>[102]</sup> d.h. diese Sequenz bevorzugt eine  $\beta$ -Strangkongformation. Anhand der Proteindatenbank (Ref. 1ba6) wird hingegen eine  $\alpha$ -Helixstruktur für diese Region von A $\beta$ <sub>40</sub> vorhergesagt. Wie erwähnt weisen NMR-Spektren in wässriger Lösung auf eine  $\beta$ -Faltblattstruktur in dieser Region von A $\beta$ <sub>42</sub> hin.<sup>[53]</sup> Die Sequenzen in dieser zentralen Region sind auch deshalb interessant, weil die  $\alpha$ -Sekretase zwischen K und L spaltet und die Fragmente keine Fibrillen bilden.<sup>[49]</sup>

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Identifizierung von Inhibitoren der A $\beta$ -Aggregation.<sup>[103]</sup> Potente, peptidische Inhibitoren weisen einen Nachteil auf: Sie können aufgrund ihrer Größe die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden. Vielversprechender sind kleine organische Moleküle wie das Anthracyclin **6**, Rifampycin **7** oder das Benzothiazin **8** (Abb. 7), die den Prozess der A $\beta$ -Aggregation *in vivo* hemmen. Da jedoch die Interaktionsflächen zwischen A $\beta$ -Molekülen groß sind, gibt es viele mögliche Bindungsstellen und die Hemmwirkung ist relativ niedrig. Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung von  $\beta$ -Faltblattmimetika, die aus 3-Aminopyrazol-Mimetika oder 3-Aminopyrazol-Motiven (**9**, Abb. 7) in Peptiden bestehen und Bindungsaffinitäten an A $\beta$ -Fragmente im nanomolaren Bereich aufweisen.<sup>[104, 105]</sup>



**Abb. 7:** Inhibitoren der Fibrillenbildung von A $\beta$ : Anthracyclin (6), Rifampicin (7), Benzothiazin (8), trimeres 3-Aminopyrazol (9)

### 1.3 $\gamma$ -Sekretase als Target zur Behandlung von Morbus Alzheimer

Die  $\gamma$ -Sekretase vermittelt den entscheidenden Schritt in der Freisetzung von A $\beta$ . Auffällig dabei ist, dass die Spaltung nicht, wie für Proteasen üblich, in wässriger Umgebung erfolgt, sondern innerhalb der Transmembrandomäne des Substrats.<sup>[106]</sup> Für die Position des  $\gamma$ -Sekretaseschnitts sind dabei offenbar Länge und Struktur der Transmembrandomäne entscheidender als die genaue Aminosäuresequenz.<sup>[107, 108]</sup> Durch  $\gamma$ -Sekretasespaltung der  $\beta$ APP-CTF entstehen p3-Spezies und A $\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge sowie ein lösliches, zytosolisches Fragment des APP (AICD).<sup>[41]</sup> AICD wird in Analogie zu NICD (Notch intracellular domain) im Zusammenhang mit der Transkription bisher unbekannter Zielgene diskutiert.<sup>[109]</sup>

Die von der  $\gamma$ -Sekretase gebildeten A $\beta$ -Hauptformen sind A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ .<sup>[110]</sup> A $\beta_{42}$ , das aufgrund seiner Eigenschaft der schnellen Aggregation und Plaquebildung toxisch ist, stimmt mit etwa 5–10% der Gesamtmenge an A $\beta$  überein, das von kultivierten Zellen unter Normalbedingungen abgesondert wird. Weitere A $\beta$ -Peptide mit 19, 37–39 und 43–48 Aminosäuren wurden nur in geringen Mengen identifiziert.<sup>[111]</sup> Je länger die Peptide, umso unlöslicher sind sie und neigen stärker zur Aggregation. Die  $\gamma$ -Sekretase vermittelt auch die Entstehung der APP-Intrazellulären-Domäne (AICD) durch eine Spaltung an der  $\varepsilon$ -Stelle, die neun Aminosäuren von der  $\gamma$ 40-Stelle entfernt ist.<sup>[112]</sup> Die Beziehung zwischen  $\gamma$ - und  $\varepsilon$ -Spaltung wurde durch die Isolierung von A $\beta_{49}$  entdeckt.

Wie die  $\beta$ -Sekretase ist auch die  $\gamma$ -Sekretase eine Aspartylprotease. Die natürlichen Substrate dieser Proteasen werden im aktiven Zentrum über einen Säure-Base-Mechanismus hydrolysiert (Abb. 8). Dabei wird die zu spaltende Amidbindung nukleophil von einem Wassermolekül angegriffen, welches durch das zweite Aspartat deprotoniert und dadurch aktiviert wird (A). Durch diesen konzertierten Angriff wird das aktivierte Amid (B) schließlich gespalten (C).

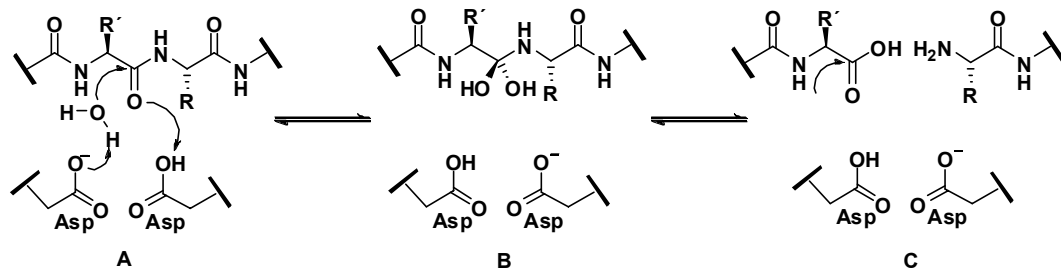


Abb. 8: Mechanismus der Proteolyse in Aspartylproteasen

### 1.3.1 Der $\gamma$ -Sekretase-Komplex

Biochemische und genetische Studien zeigten, dass Presenilin (PS), Nicastrin, *Anterior pharynx defective-1* (Aph-1) und *Presenilin enhancer-2* (Pen-2) den enzymatisch aktiven Kern des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes bilden.<sup>[113]</sup> Der Komplex bildet sich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird dann in das späte ER transportiert, wo die Substratspaltung erfolgt. Er kommt auch in Mitochondrien vor, wo er vermutlich eine unterstützende Rolle bei der Apoptose spielt.

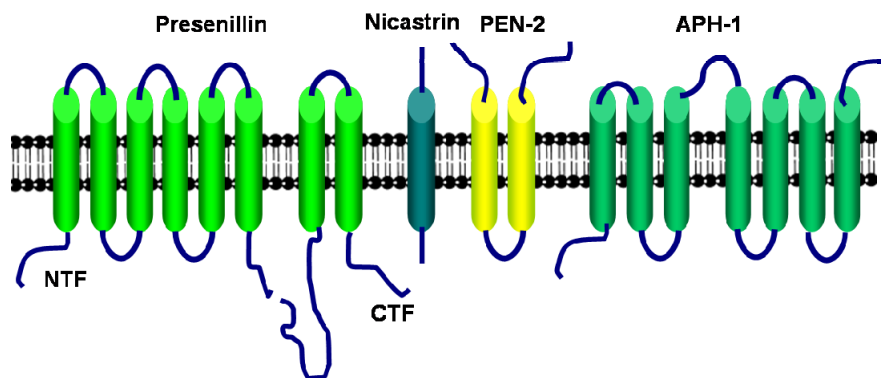


Abb. 9: Schematische Darstellung des  $\gamma$ -Sekretasekomplexes. Modellzeichnungen der einzelnen Proteine des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes und Orientierung in der zellulären Membran (modifiziert nach [20])



Die Preseniline 1 (PS1) und 2 (PS2) wurden mit der Alzheimerkrankheit bzw. der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität in Verbindung gebracht, da zum einen zahlreiche FAD-Mutationen innerhalb der PS-Gene bekannt sind, die die Bildung des A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptids stimulieren<sup>[20]</sup> und zum anderen keine A $\beta$ -Produktion in murinen PS1- und PS2-Doppelknockout-Zellen nachweisbar ist.<sup>[114-117]</sup> Die anderen identifizierten Untereinheiten sind wohl für den richtigen Aufbau sowie für die subzelluläre Lokalisierung des aktiven Enzymkomplexes notwendig.<sup>[118]</sup>

Wirbeltiere haben zwei Presenilin-Gene: PSEN1 befindet sich auf Chromosom 14 und enthält die Erbinformation für PS1; PSEN2 mit der Information für PS2 befindet sich auf Chromosom 1. Durch Einführung von Glykolisierungsstellen in PS1 konnte festgestellt werden, dass die Struktur wahrscheinlich aus 9 oder 10 Transmembrandomänen (TM) besteht.<sup>[119]</sup> Die sechste und siebte Domäne trägt die zwei katalytisch wirkenden Aspartate D<sub>257</sub> und D<sub>385</sub>, die für die Produktion von A $\beta$  entscheidend sind. Der Verlust bzw. Austausch nur eines Aspartats infolge einer Mutation führt zu einer Hemmung der A $\beta$ -Produktion.<sup>[120]</sup>

<sup>[121]</sup> Für die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität sind neben PS als katalytische Untereinheit allerdings weitere Komponenten notwendig: Nicastrin ist ein Typ-1 Transmembranprotein (~130 kDa), das an PS binden kann und bei der Endoproteolyse von PS1 eine entscheidende Rolle spielt.<sup>[122]</sup>

Nicastrin wird für die Reifung und den Transport der anderen Proteine des Komplexes benötigt, ist aber selbst nicht katalytisch aktiv. Die extrazelluläre Domäne des Nicastrins interagiert mit der N-terminalen Region des Substrats und ermöglicht so den Transport zum Komplex.<sup>[122]</sup> Aph-1 und Pen-2 werden als Regulatoren des Reifungsprozesses des katalytisch aktiven Presenilins angesehen. Aph-1 ist ein Protein, das zuerst im Notch-Stoffwechselweg des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* als Regulator der Lokalisierung von Nicastrin an der Zelloberfläche gefunden wurde. Aph-1 ist 30 kDa schwer und weist sieben Transmembrandomänen auf. Es bildet mit Nicastrin einen Subkomplex und spielt bei der Stabilisierung des PS-Komplexes eine wichtige Rolle.<sup>[122]</sup> APH-1 enthält das konservierte  $\alpha$ -Helix-Bindungsmotiv Glycin-X-X-X-Glycin (kurz: GXXXG). Dieses ist sowohl bei der Bildung als auch bei der Reifung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes entscheidend.<sup>[123]</sup> Pen-2 ist ein integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen aus 101 Aminosäuren.<sup>[124, 125]</sup>

Wahrscheinlich befinden sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus nach der Translation zunächst im Lumen des ER und später außerhalb der Zelle. Die C-terminale Domäne von Pen-2 induziert die Endoproteolyse von PS und stabilisiert die N-terminalen (NTF) und C-terminalen (CTF) Fragmente.<sup>[126]</sup>

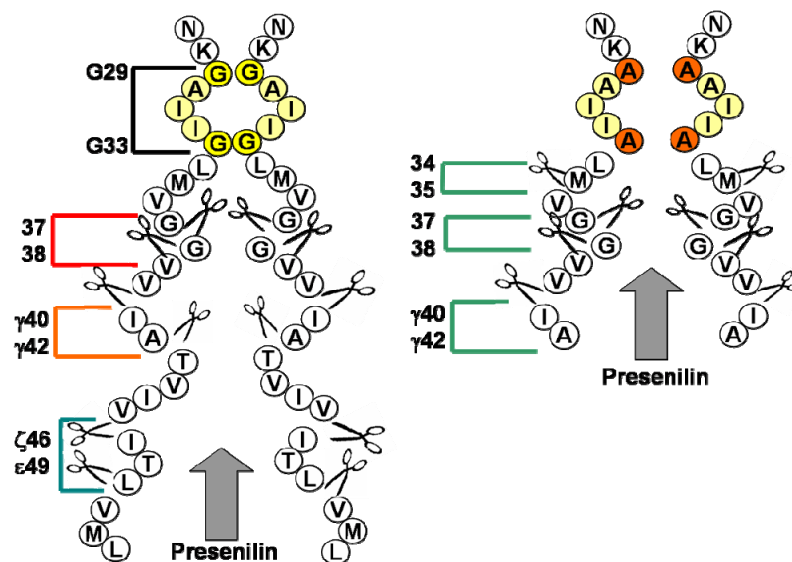
Zhou et al. schlugen ein Modell für die Bildung des Komplexes vor. Demnach bildet Nicastrin einen Subkomplex mit Aph-1, der in das ER eintritt. Zusammen mit PS bildet sich

dann ein Trimer. Nicastrin wird anschließend im Golgi-Apparat vollständig glykolysiert. Der Eintritt von Pen-2 aktiviert schließlich den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex.<sup>[122]</sup>

Die Endoproteolyse von PS resultiert in der Bildung der NTFs und CTFs. Diese beiden Fragmente enthalten eines der Aspartate, bleiben miteinander verbunden und bilden so ein Heterodimer, das das aktive PS enthält.<sup>[127]</sup>

Multhaup *et al.* legten neue Aspekte über den Mechanismus der  $\gamma$ -Sekretasespaltung dar.<sup>[128]</sup>

Demnach soll die Dimerisierung von zwei APP-Transmembransequenzen über G29 und G33 als Gelenk für die Substratdimerisierung essentiell für die  $A\beta_{40}$ - und  $A\beta_{42}$ -Produktion sein. Dieses Gelenk stellt eine sterische Hinderung für die  $\gamma$ -Sekretasespaltung dar (Abb. 10). Die Mutationen G29A und G32A lösen die Hinderung auf und begünstigen dann die normale Spaltung zu  $A\beta_{38}$  and  $A\beta_{37}$ .



**Abb. 10:** Modell des  $\gamma$ -Sekretase-Spaltungsmechanismus von dimeren APP-Transmembransequenzen. Links: Die Sequenz G29–G33 stellt eine sterische Hinderung dar. Rechts: Die Mutante ermöglicht die normale Spaltung (vgl. Multhaup [128]).

Die Aufreinigung des endogenen  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes ergab, dass eine fünfte Untereinheit, das Membranprotein CD147, existiert. Es konnte gezeigt werden, dass CD147 die Aktivität des Komplexes als nicht essentieller Regulator erniedrigt.<sup>[129]</sup> Weiterhin wurden weitere transiente oder schwache Bindungspartner des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes wie GSK3, Phospholipase D1 (PLD1) und Transmembranprotein 21 (TMP21) entdeckt.<sup>[122]</sup> Obwohl diese Bindungspartner entscheidend für die Aktivität der Sekretase sind, wurde keines dieser Proteine in aufgereinigten Proben detektiert.

Neben der Spaltung der APP-CTF katalysiert die  $\gamma$ -Sekretase auch die Spaltung weiterer Substrate innerhalb der Membran. Hierzu gehören die APP-Homologen APLP,<sup>[116, 130]</sup> die

Notch-Rezeptoren 1-4,<sup>[131-134]</sup> die Notch-Liganden Delta und Jagged,<sup>[135, 136]</sup> die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB-4,<sup>[137, 138]</sup> E- und N-Cadherin,<sup>[139, 140]</sup> der LDL-Rezeptor,<sup>[141]</sup> CD44<sup>[142, 143]</sup> und Nectin1 $\alpha$ .<sup>[144]</sup> Der Notch-Signaltransduktionsweg ist hoch konserviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung<sup>[145, 146]</sup> und im adulten Gewebe sowie bei der Differenzierung der T-Lymphozyten.<sup>[147]</sup> Der Notch-Rezeptor 1 ist ein Typ-1 Transmembranprotein und wird nach der Translation am ER über den sekretorischen Prozessierungsweg an die Zelloberfläche transportiert. Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) erfolgt eine proteolytische Spaltung des Rezeptors durch eine Furin-ähnliche Protease. Die beiden Spaltprodukte bleiben anschließend als Heterodimer assoziiert. An der Zelloberfläche fungiert das Notch-Heterodimer als Rezeptor für Liganden wie Delta und Serrate.<sup>[145]</sup> Nach der Bindung eines Notch-Liganden wird die Ektodomäne des Notch-Moleküls durch Metalloproteasen, wie z.B. ADAM17/TACE oder ADAM10, abgespalten.<sup>[148]</sup> Das in der Membran verbleibende Fragment wird von der  $\gamma$ -Sekretase gespalten. Die freigesetzte intrazelluläre Domäne (NICD = Notch intracellular domain) wird in den Nukleus transportiert und steuert dort die Transkription von bestimmten Zielgenen.<sup>[145, 146]</sup> Der Notch-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung: Mutationen an Genen, die die Notch-Rezeptoren codieren, führen zu erhöhten NICD-Spiegeln.<sup>[146]</sup> Da die meisten Notchmutanten die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase benötigen, könnten  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren dazu dienen, Krebsformen zu therapieren, die durch den Notch-Signalweg stimuliert werden.

### 1.3.2 $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren

Um die Ursachen der AD zu lindern, müssen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren die A $\beta$ -Sekretion ausreichend reduzieren, jedoch dürfen sie weder die Sekretion noch die Prozessierung anderer Proteine, die wichtige neuronale Aufgaben aufweisen, vollständig aufheben.<sup>[149]</sup> Spezielle Merkmale des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes verhindern bislang dessen Kristallisation und so die Kristallstrukturanalyse – ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist derzeit nicht möglich. Dennoch wurden besonders im letzten Jahrzehnt zahlreiche potente  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren entwickelt und optimiert.<sup>[28, 150]</sup> Die Fortschritte in den letzten Jahren weisen in die richtige Richtung:  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren, die die APP-Prozessierung verändern, jedoch keine weiteren Nebenwirkungen erzeugen.

In den letzten Jahren nahmen die Anstrengungen zu, Informationen über die Bindungsstellen der Inhibitoren an das Enzym zu finden. Wolfe et al. erläuterten den Mechanismus von verschiedenen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren.<sup>[151]</sup> Demnach binden die meisten direkt an ein aktives

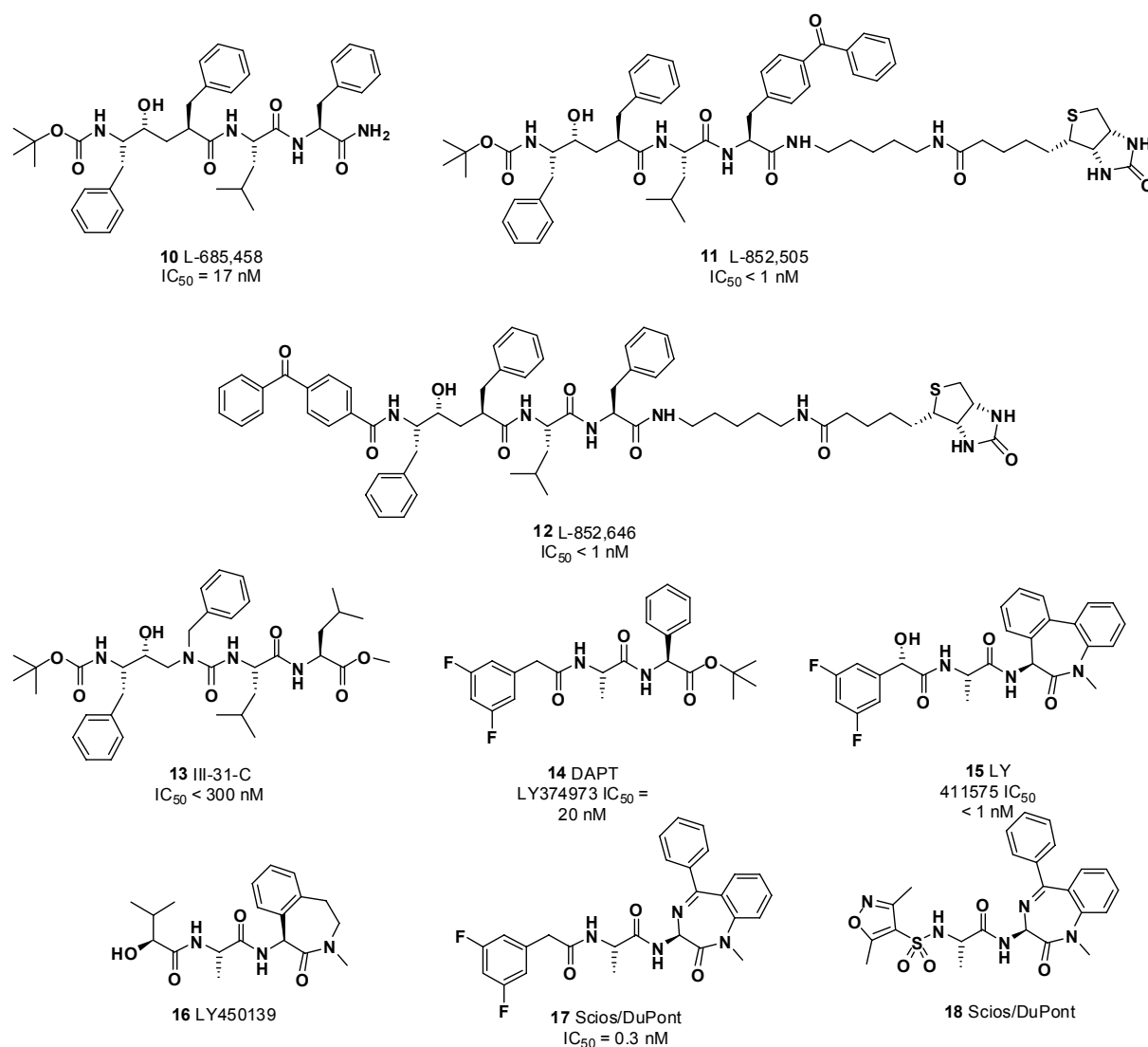
Zentrum (*Active Site*) oder verändern dieses durch einen allosterischen Mechanismus. Einige Inhibitoren, z.B. Isocumarine, hemmen die A $\beta$ -Produktion nicht durch eine Wirkung auf das aktive Zentrum der Protease. Demnach beeinflussen sie die  $\gamma$ -Sekretase nicht direkt. Weihofen *et al.* zeigten, dass Inhibitoren der Signal-Peptid-Peptidase (SPP) auch die  $\gamma$ -Sekretase inhibieren, was darauf hindeutet, dass beide Enzyme sehr ähnliche Bindungsstellen sowie den gleichen proteolytischen Mechanismus aufweisen.<sup>[152]</sup>

Verbindungen, die die Produktion aller A $\beta$ -Spezies hemmen, werden im Folgenden als  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) bezeichnet, während Verbindungen, die selektiv die Sekretion des pathologischen A $\beta_{42}$  verändern, als  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren (GSM) bezeichnet werden. Sogenannte inverse GSMs senken entweder die A $\beta_{38}$ -Produktion, ohne dabei die A $\beta_{40/42}$ -Produktion zu beeinflussen, oder erhöhen die A $\beta_{42}$ -Produktion.

Zu den potentesten GSIs zählen die peptidische Strukturen wie L-685,458 (**10**, IC<sub>50</sub> = 17 nM, Abb. 11) von Merck Sharp & Dohme (MSD).<sup>[153]</sup> Aus einer HTS-Leitstruktur entwickelte Elan den semi-peptidischen GSI DAPT (**14**, IC<sub>50</sub> = 20 nM; HEK). Anhand von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) stellte sich heraus, dass der Phenylglycinrest und der Difluorphenylessigsäurebaustein entscheidend zur Aktivität der Verbindung beitragen.<sup>[154]</sup> Die subkutane Verabreichung von DAPT bei Mäusen in relativ hohen Mengen (100 mg/kg) hatte eine 50%ige Reduktion des kortikalen A $\beta$ -Niveaus innerhalb von 3 Stunden zur Folge. Eine 40%ige Erniedrigung konnte bei oraler Verabreichung derselben Menge beobachtet werden. Auf den ersten Blick erscheinen diese Zahlen sehr viel versprechend, allerdings wurde in der Arbeit nicht über A $\beta$ -Gehirnspiegel berichtet.<sup>[155]</sup> Zudem wurde in weiteren vorklinischen Studien gezeigt, dass DAPT in hohem Maße den Notch-Signalweg beeinträchtigt (100 - 1000 mal stärker), so dass eine hohe *in vivo* Toxizität zu beobachten ist.<sup>[147, 156, 157]</sup>

DAPT und Co (Verbindungen **10**, **13** und **14**) wurde mit Biotin sowie photoaktivierbaren Gruppen (z.B. Benzophenon, Diazirin) versehen. Diese Verbindungen (z.B. **11**, **12**, Abb. 11) zeigten weiterhin potente Hemmung des Enzyms (IC<sub>50</sub> < 1 nM). Durch die starke Wechselwirkung mit Streptavidin kann der Biotin-Komplex leicht isoliert und analysiert werden. Das Photolyseexperiment mit L-852,505 (**11**) in Anwesenheit der  $\gamma$ -Sekretase lieferte ein Protein mit 20 kDa. Durch spezifische Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um das CTF-PS1 handelt. Das Photolyseexperiment mit L-852,646 (**12**) in Gegenwart der  $\gamma$ -Sekretase führte zu einem 34 kDa schweren Fragment, das als NTF-PS1 identifiziert wurde. Mittels affinitätschromatographischen Experimenten mit der Verbindung **13** (III-31-C, IC<sub>50</sub> < 300 nM)<sup>[158]</sup> wurden PS1-CTF, PS1-NTF und Nicastrin<sup>[159]</sup> isoliert.

Die Autoren schlagen einen Bindungsmechanismus vor, wonach PS1 eine Bindungstasche für dipeptidische GSIs mit Bindungsstellen für Difluorbenzol, Caprolactam und Phenylglycin aufweist. Die Bindungsstelle für Phenylglycin und Caprolactam befindet sich auf PS1-CTF, die für Difluorbenzol auf PS1-NTF.<sup>[160]</sup>



**Abb. 11:** Peptidische und semipeptidische  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

Umfassende *in vivo* Analysen wurden auch mit LY-411575 (**15**, DBZ, Abb. 11), einer Weiterentwicklung von DAPT, durchgeführt. Die Einführung einer Hydroxygruppe und die starre räumliche Anordnung zweier Phenylreste in einem Caprolactam-Motiv erhöhten die Aktivität um das 20fache ( $IC_{50} < 1 \text{ nM}$ ). Durch orale Verabreichung von 1 mg/kg bei drei bis fünf Monate alten tg2576 Mäusen halbierte **15** den Plasmaspiegel sowie das kortikale A $\beta$ -Niveau innerhalb von 3 Stunden.<sup>[155]</sup> Eine Studie, in der ein weniger aktives Diastereomer

transgenen Mäusen über 15 Tage oral verabreicht (1–10 mg/kg pro Tag) wurde, beschreibt allerdings neben der Reduktion des A $\beta$ -Niveaus ein Auftreten von Thymusatrophie sowie einen Verfall des intestinalen Epithels bei den Versuchstieren.<sup>[161]</sup> Die Notch/APP-Selektivität wurde in zellulären Assays bestimmt: IC<sub>50</sub>(A $\beta$ <sub>40</sub>) = 0.082 nM, IC<sub>50</sub>(Notch) = 0.39 nM. Trotz der teils sehr hohen Aktivitäten zeigt dieses schmale Toxizitätsfenster die limitierte Möglichkeit, Verbindungen des DAPT-Strukturtyps für erfolgreiche klinische Studien einzusetzen. Dennoch präsentierte E. Siemers die Ergebnisse der klinischen Studien (Phase 1 und 2) von LY450139 (**16**, Abb. 11), das weniger potent ist als **15**,<sup>[162]</sup> jedoch selektiver gegenüber der APP-Spaltung. Die orale Verabreichung von **16** an gesunde Personen lieferte verminderte A $\beta$ <sub>total</sub>-Plasmaspiegel von 74.3% (40 mg/d, 14 Tage). Dabei war die Zeit der Probenentnahme entscheidend: eine Einzeldosis führte zu einer signifikanten Reduktion an A $\beta$ <sub>total</sub> 3–6 h nach Gabe, jedoch auch zur Wiederherstellung und Überschreitung innerhalb von 12 h. Die Spiegel in der Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit (*Cerebrospinal fluid*, CSF) blieben konstant. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Phase IIa veröffentlicht.<sup>[163]</sup> Die Gabe von 30–40 mg/d über 6 Wochen an 70 AD-Patienten führte zu einer A $\beta$ -Plasma-Reduktion um 38%. Wieder wurden keine Änderungen im CSF beobachtet. Ferner trat ein Fall von schwerem Barret-Ösophagus auf, die Biopsie schließt allerdings eine Wirkung auf den Notch-Signalweg aus. Die Studienergebnisse der Phase IIb (randomisiert, placebokontrolliert, doppelblind, Dosis: 100 mg, 140 mg, 51 AD-Patienten, 14 Wochen) wurden auf der zweiten Internationalen Konferenz zur Bekämpfung von Demenz in Washington 2007 von Fleisher *et al.* vorgestellt. Drei Nebenwirkungen wurden beobachtet: Darmverschluß, Hämoglobin-positiver Stuhl und Diarrhö. Im Plasma kam es zu einer Reduktion von A $\beta$ <sub>40</sub> um 58.2% bei einer Gabe von 100 mg und um 64.6% bei der 140 mg-Gruppe, jedoch war keine signifikante Reduktion im CSF nachweisbar: 100 mg = 20%, 140 mg = 11%, Placebo = 6%. Es wurde eine Halbwertszeit von  $t_{1/2}$  = 2.59 h bei einer maximalen Serumkonzentration bei 1.68 h und 140 mg beobachtet. Kognitive oder funktionelle Verbesserungen konnten nicht beobachtet werden.

DuPont Pharmaceuticals entwickelte eine weitere potente Difluorphenacylcaprolactam-Verbindung (**17**, IC<sub>50</sub> = 0.3 nM, Abb. 11).<sup>[164]</sup> **17**, besser bekannt als Compound E, ist ein potenter, selektiver, nichtkompetitiver Inhibitor der APP- und Notch-Prozessierung. Bristol-Meyers Squibb und DuPont verbesserten das Caprolactam-Motif letztlich mit dem Ziel, die Patente von Elan zu umgehen und zu erweitern. Die Struktur des Oxazolylsulfonamides (**18**) stellt ein Beispiel dar.<sup>[165]</sup>

Zahlreiche Patente pharmazeutischer Unternehmen enthalten als Strukturelemente Sulfone oder Sulfonamide. Amgen stellt Fenchylaminsulfonamide als moderate Inhibitoren vor (z.B. **19**,  $IC_{50} = 1.8 \mu M$ , HEK293-Zellen, Abb. 12).<sup>[166]</sup> BMS-299897 (**20**)<sup>[167]</sup> reduziert A $\beta$  dosis- und zeitabhängig im Gehirn, CSF sowie im Plasma in jungen, transgenen Mäusen. Zudem war die Verbindung **20** 15-fach effektiver und selektiver gegenüber der APP-Spaltung im Vergleich zur Notch-Spaltung *in vitro* ( $IC_{50}(APP) = 7.1 \text{ nM}$ ,  $IC_{50}(Notch) = 105.9 \text{ nM}$ ). Schering-Plough und Merck Sharp & Dome (MSD) patentierten eine Vielzahl an Sulfonen und Sulfonamiden wie z.B. das Piperidinderivat **21** ( $IC_{50} = 0.2 \text{ nM}$ ) und das bicyclische Sulfonamid **22**.<sup>[168]</sup> Die Bayer AG patentierte Sulfone wie **23** (Abb.12)<sup>[169]</sup> und verwandte Verbindungen finden sich in den Patenten von Daiichi Pharm Co. (z.B. **24**,  $IC_{50} < 50 \text{ nM}$ , H4-Zellen). *N*-(Oxoazepanyl)-Benzolsulfonamide von Elan zeigen gute Aktivitäten (z.B. **25**  $IC_{50} = 0.1\text{-}25 \text{ nM}$ ).<sup>[170]</sup> Ein verwandtes Elanpatent beschreibt die Synthese von *N*-substituierten heterocyclischen Sulfonamiden wie **26** als potente GSIs mit minimaler Notch-Inhibition.<sup>[171]</sup> Fluor-substituierte 2-Oxoazepane von Roche (z.B. **27**) weisen  $IC_{50}$ -Werte von 2 nM auf und wurden für die Behandlung von AD oder Krebs vorgeschlagen.<sup>[172]</sup>

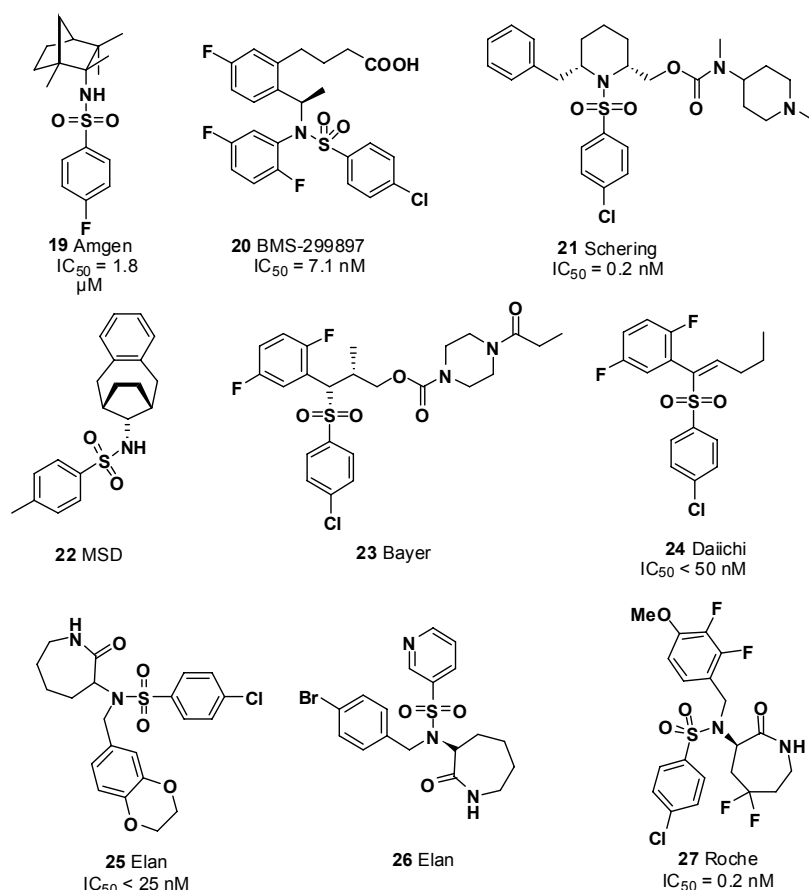


Abb. 12: Nicht-peptidische  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

Sowohl die Azepine als auch die Sulfonamide binden an ein allosterisches Zentrum von Presenilin, das von der Bindungsstelle der peptidischen GSIs abweicht.<sup>[173]</sup> Zhao *et al.* identifizierten drei Aminosäuren auf PS1 (L172, T281 und L282), die für die PS1-Selektivität der Sulfonamid-Inhibitoren (z.B. BMS-299897) verantwortlich sind.<sup>[174]</sup>

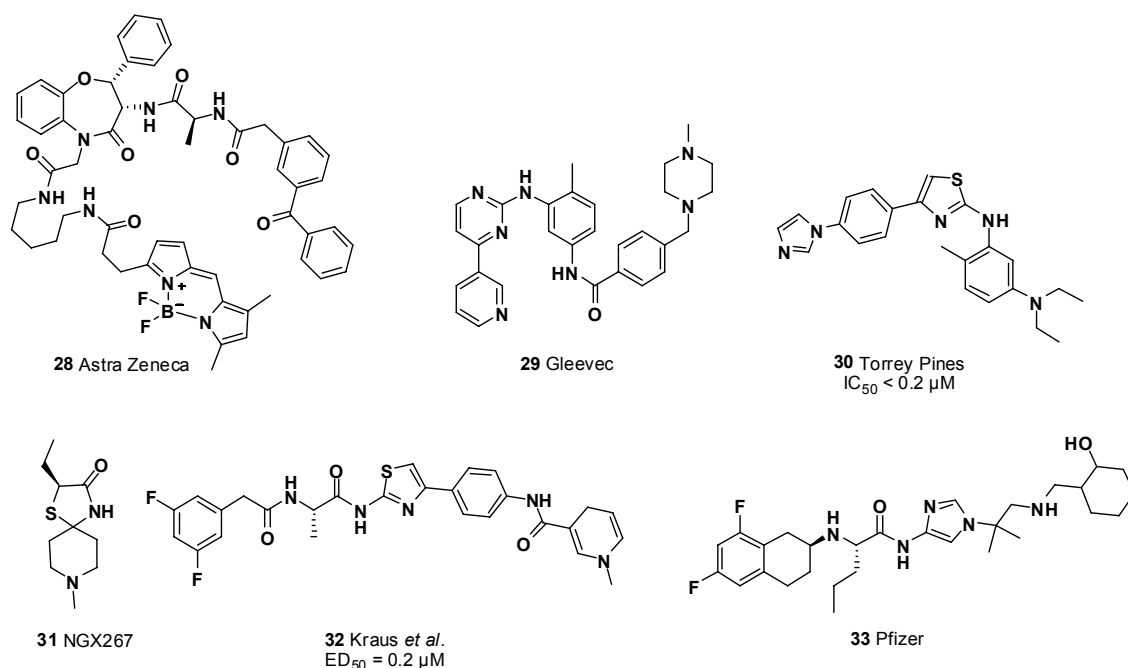
AstraZeneca stellte neue Proben für die Detektion, die Charakterisierung und die Isolierung der  $\gamma$ -Sekretase vor. In den Patenten finden sich biotinylierte und Bodipy-markierte Verbindungen (z.B. **28**, Abb. 13) sowie die Bestimmung von  $A\beta_{40}$  in HEK Zellen, allerdings keine Assaydaten.<sup>[175]</sup> Gleevec (**29**) inhibiert die  $A\beta$ -Produktion, allerdings nicht die Notch-Spaltung.<sup>[176]</sup> Fraering *et al.* veröffentlichten die  $IC_{50}$ -Werte für  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  sowie die AICD Bildung bei  $\sim 75 \mu M$ . Die Bildung von NICD wurde selbst bei 10fach erhöhter Konzentration nicht inhibiert. Die Autoren schlugen eine potentielle Nukleotid-Bindungsdomäne auf der  $\gamma$ -Sekretase vor, da ATP in der Lage war, die durch Gleevec gehemmte Enzymaktivität wieder herzustellen. Ein weiteres Indiz spricht für diese Hypothese:  $\gamma$ -Sekretase bindet über das  $\gamma$ -Phosphat an ATP-Acrylamidharze.<sup>[177]</sup> Torrey Pines Therapeutics (früher Neurogenetics) beschrieben eine Vielzahl von Amino-thiazolderivaten mit  $A\beta_{40/42}$ -senkender Aktivität (z.B. **30**,  $IC_{50} < 0.2 \mu M$ , Abb. 13).<sup>[178]</sup> Zudem stellte das Unternehmen Daten ihrer klinischen Studien vor: Für die AD-Leitstruktur NGX267 (**31**) präsentierte M. Murphy die Ergebnisse der Phase I (Salzburg 2007, 8th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases). **31** ist ein muskarinischer Acetylcholinrezeptor-Agonist (M1-Rezeptor-Agonist), der eine Absenkung der  $A\beta_{42}$ -Produktion hervorruft. Die Studie wurde mit 90 gesunden Männern durchgeführt (randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert) und dabei wurden Dosen von 10, 20, 30 und 35 mg untersucht. Eine Beeinflussung des cholinergen Systems wurde durch eine Erhöhung des Speichelflusses festgestellt, zudem ließen sich keine Nebeneffekte feststellen. NGX267 oder (*S*)-2-Ethyl-8-methyl-1-thia-4,8-diazaspiro(4.5)-decan-3-on ist identisch mit AF267b, das durch Abraham Fisher patentiert wurde.<sup>[179]</sup> Vorklinische Daten unterstützen den dualen Wirkmechanismus. Es wurde gezeigt, dass NGX267 analog Acetylcholin M1-Rezeptoren stimuliert. Zudem verringert NGX267 den  $A\beta_{42}$ -Gehirnspiegel bei Mäusen und Hasen.<sup>[180]</sup> Zusätzlich stellte das Unternehmen zwei weitere Kandidaten zur Behandlung von AD vor: NGX292 und NGX97555. NGX292 ist ein naher Verwandter von NGX267 und ebenfalls ein M1-Rezeptor-Agonist. Die Verbindung ist laut S. Wagner ein GSM (Salzburg 2007). Die Struktur von NGX97555 wurde noch nicht offengelegt. Die Verbindungen der Serie 555 binden laut der Hypothese des Unternehmens an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex und regulieren nach einem allosterischen Mechanismus die  $A\beta$ -Spaltung hin zu erhöhten



A $\beta_{37/38}$ -Konzentrationen, ohne dabei die katalytische Aktivität des Komplexes zu beeinträchtigen. Die veränderten Verhältnisse der A $\beta$ -Isoformen und A $\beta_{\text{total}}$  (IC<sub>50</sub> (A $\beta_{42}$ ) = 10 nM, IC<sub>50</sub> (A $\beta_{40}$ ) = 64 nM, SY5Y-Zellen), sowie die erhaltene Notch- und E-Cadherin-Prozessierung unterstützt die Einordnung von NGX97555 als GSM. Ähnliche Änderungen der Verhältnisse der A $\beta$ -Isoformen wurden *in vivo* beobachtet (25-50 mg/kg, 3 Tage). NGX97555 ist vermutlich ein naher Verwandter der Verbindung **30** (Abb. 13).<sup>[181]</sup>

Das substituierte Thiazolylamid **32** (IC<sub>50</sub> = 0.2  $\mu$ M) wurde mit einem sogenannten *redox chemical delivery system* (RCDS) ausgestattet, um so die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern.<sup>[182]</sup> Der Wirkstoff wurde mit einem hydrophoben Dihydropyridin-Träger verbunden, welcher den schnellen Transfer über die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass Verbindung **32** nach 30 Minuten dreifach besser die Blut-Hirn-Schranke überwindet als eine entsprechende Verbindung ohne den RCDS-Rest.

Ein Pfizerpatent enthält über 350 Imidazolylamide wie **33**, welche die Bildung von A $\beta$ -Peptiden hemmen.<sup>[183]</sup>

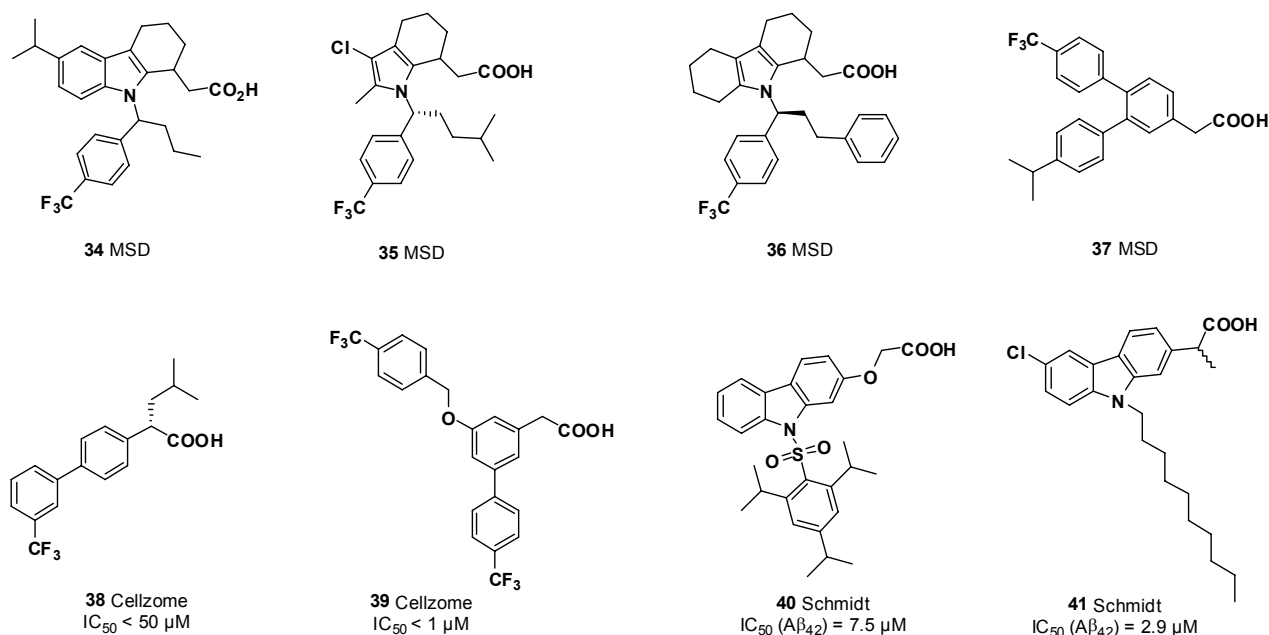


**Abb. 13:** Nichtpeptidische  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

MSD patentierte selektive GSM wie **34** (Abb. 14).<sup>[184]</sup> Die Carbonsäure scheint wichtig zu sein, um das gewünschte Verhältnis von A $\beta_{38}$ /A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  zu erhalten. Die Modulation ist von der vollständigen Inhibierung zu unterscheiden, da die A $\beta_{\text{total}}$ -Konzentration nicht beeinträchtigt sein muss. Tetrahydroindole wie **35** und **36**<sup>[185]</sup> sowie Arylessigsäuren (z.B. **37**)<sup>[186]</sup> zeigen eine Hemmung der A $\beta_{42}$ -Konzentration; die IC<sub>50</sub>-Werte der potentesten

Verbindungen liegen etwa zwei bis fünffach, z.T. sogar 50fach niedriger als die Werte für A $\beta$ <sub>40</sub> (SH-SY5Y-Zellen). Nah verwandte *S*-Enantiomere von Arylessigsäuren und Biphenylessigsäuren (**38** and **39**) der Cellzome AG weisen ebenfalls modulierende Eigenschaften auf (z.B. **39**, IC<sub>50</sub>(A $\beta$ <sub>42</sub>) < 1  $\mu$ M, SKN-Neuroplasten).<sup>[187, 188]</sup>

*N*-Sulfonylierte und *N*-alkylierte Carbazolyloxyessigsäuren zeigen ebenfalls eine potente Modulation.<sup>[189]</sup> Die Einführung von lipophilen Substituten wie Alkyl- oder Sulfonylreste unterstützen dabei die modulierenden Eigenschaften (z.B. **40**, IC<sub>50</sub>(A $\beta$ <sub>42</sub>) = 7.5  $\mu$ M, Abb. 14). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Einführung von elektronenschiebenden Gruppen die Modulation verringert oder umkehrt. Neben Aktivitäten im unteren mikromolaren Bereich zeigen die Verbindungen nur eine geringe oder keine Wirkung auf die  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung der  $\epsilon$ -Schnittstelle. Dieses Prinzip konnte auch auf Carprofen, ein COX-2 Inhibitor, übertragen werden. Eine *N*-Substitution resultierte in potenten Modulatoren der  $\gamma$ -Sekretase (z.B. **41**, IC<sub>50</sub>(A $\beta$ <sub>42</sub>) = 2.9  $\mu$ M).

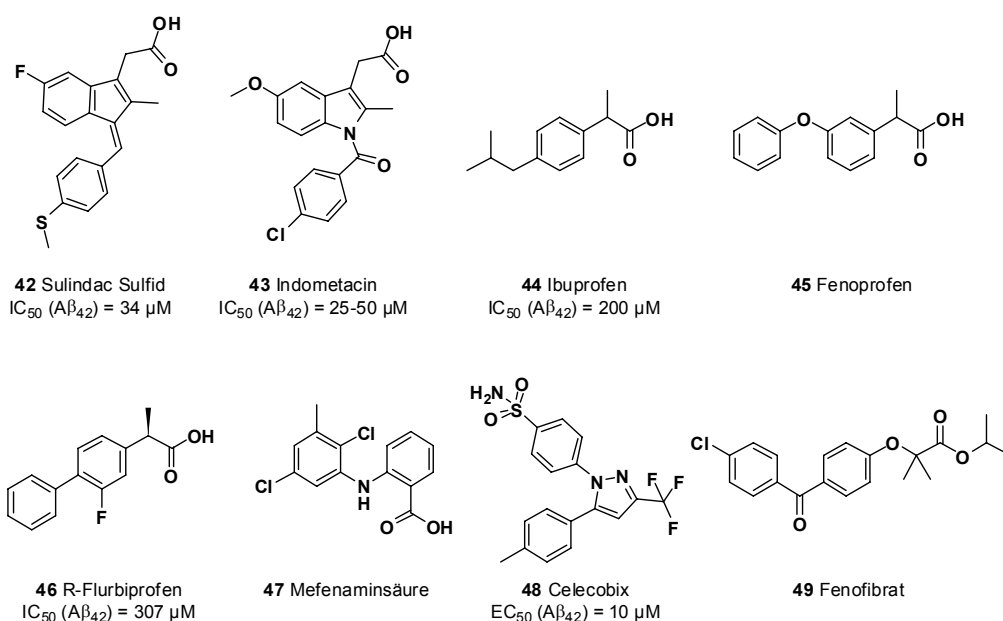


**Abb. 14:** Nichtpeptidische  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

Die lipophilen Substituenten sowie die Säurefunktionalität verursachen amphiphile Eigenschaften, was zu Interaktionen mit der Membran führen könnte. Es wird demnach vermutet, dass die Verbindungen keine oder nur eine geringe Wirkung auf die  $\gamma$ -Sekretase-vermittelte Signalwirkung über die intrazellulären Domänen der Substrate haben.

In Gehirnen von AD-Patienten zeigen sich zahlreiche Entzündungsprozesse.<sup>[190]</sup> Es wurde gezeigt, dass entzündungshemmende Wirkstoffe, sogenannte nichtsteroidale Antirheumatika (*non steroidal anti inflammatory drugs*, NSAIDs) den Fortschritt der AD hemmen können.<sup>[18]</sup> Einige dieser Wirkstoffe befinden sich momentan in klinischen Studien.

Weggen *et al.* wiesen nach, dass drei NSAIDs eine selektive A $\beta$ <sub>42</sub>-senkende Aktivität in unterschiedlichen Zelllinien aufweisen.<sup>[191]</sup> Sulindacsulfid (**42**) und Indomethacin (**43**) senken die A $\beta$ <sub>42</sub>-Sekretion um 25–50  $\mu$ M, Ibuprofen (**44**) weist einen IC<sub>50</sub>-Wert von 250  $\mu$ M auf. Bei der höchsten, nichttoxischen Konzentration trat eine Hemmung von 70–80% der A $\beta$ <sub>42</sub>-Sekretion auf. Die Sekretion von A $\beta$ <sub>40</sub> wurde nicht beeinflusst. Nicht alle NSAIDs zeigen diese Aktivität: Aspirin<sup>®</sup> und Naproxen verändern weder den A $\beta$ <sub>40</sub>- noch den A $\beta$ <sub>42</sub>-Gehirnspiegel.<sup>[191]</sup> Eriksen *et al.* identifizierten weitere NSAIDs mit A $\beta$ <sub>42</sub>-senkender Wirkung wie Fenoprofen (**45**), Flurbiprofen (**46**) und Mefenaminsäure (**47**) (Abb. 15).<sup>[192]</sup>

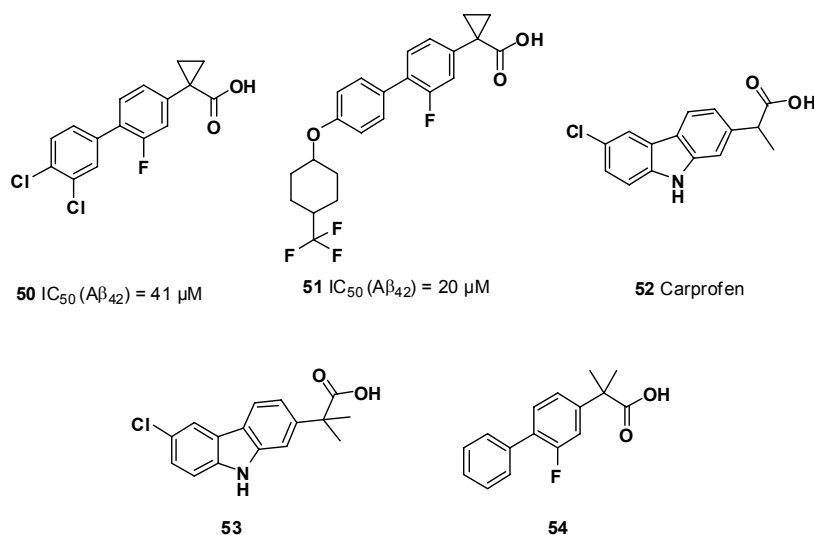


**Abb. 15:** NSAIDs modulieren die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität

Einige Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Inhibitoren wie Celecoxib (**48**) oder verwandte Strukturen wie der *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$*  (PPAR- $\gamma$ )-Antagonist Fenofibrat (**49**) erhöhen selektiv die A $\beta$ <sub>42</sub>-Konzentrationen und wirken demnach als inverse GSM.<sup>[193, 194]</sup> Die vorgestellten GSMs haben keine Wirkung auf die Spaltung anderer Substrate der  $\gamma$ -Sekretase wie Notch,<sup>[19, 191, 194-198]</sup> daher könnten potente und verbesserte Verbindungen die dadurch verursachte Toxizität umgehen. Assays mit APP-transfizierten Zelllinien zeigten, dass die A $\beta$ <sub>42</sub>-senkenden NSAIDs weder APP-Expression, -Umsatz, -Internalisierung oder die Freisetzung der APP-Ektodomäne beeinflussen. Im Gegensatz zu den konventionellen GSIs

verursachen die NSAIDs eine Akkumulierung der APP-CTFs.<sup>[191, 194, 197]</sup> Bei einigen NSAIDs könnte die A $\beta$ -senkende Wirkung durch die Hemmung des GTP-bindenden Proteins Rho sowie der Rho-assoziierten Kinase (Rock) zusammenhängen.<sup>[199]</sup> Einige NSAIDs verändern den  $\beta$ APP-Metabolismus *in vitro* hin zu kürzeren, weniger zur Aggregation neigenden A $\beta$ -Peptiden.

Die Verbindungen **50**, **51** (Abb. 16) weisen im Vergleich zu Flurbiprofen eine verbesserte Aktivität auf. Die Einführung des Cyclopropylsubstituenten führt zum Verlust der COX-1-Inhibition. Neben einer guten oralen Bioverfügbarkeit zeigen die Verbindungen **50** und **51** lange Plasmahalbwertszeiten. Kurzzeitstudien an transgenen Mäusen zeigten eine signifikante Absenkung der A $\beta_{42}$ -Plasmakonzentration. Carprofen **52**, ein COX-2-Inhibitor, weist selbst eine schwache Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase, die dimethylierten Verbindungen von Carprofen und Flurbiprofen (**53**, **54**) hemmen in HEK-Zellen die A $\beta_{42}$ -Produktion um 40% bzw. 67% bei 100  $\mu$ M.<sup>[200]</sup>



**Abb. 16:** NSAID-Derivate, die die  $\gamma$ -Sekretase modulieren

Zahlreiche NSAIDs mit A $\beta_{42}$ -senkenden Eigenschaften befinden sich in Tierversuchen und klinischen Studien. Lim *et al.* konnten zeigen, dass eine Behandlung mit hohen Dosen an Ibuprofen über 6 Monate sowohl die Amyloid-Pathologie als auch die Entzündungsreaktionen bei transgenen Mäusen reduziert.<sup>[201]</sup> Kurzzeitstudien mit Ibuprofen zeigten, dass A $\beta_{42}$ -Spiegel in Gehirnen von jungen Mäusen ohne Plaques um 39% verringert sind (3 Monate alte tg2576 Mäuse, orale Verabreichung, 3 Tage, 50 mg/kg/d).<sup>[191]</sup> In klinischen Studien führte Indometacin zu einer Verringerung der kognitiven Störungen.<sup>[202]</sup> Doch das Auftreten von starken Nebenwirkungen durch eine Langzeitgabe von NSAIDs erschweren ihren Einsatz, besonders bei älteren Patienten. Als vielversprechende Therapie wird die

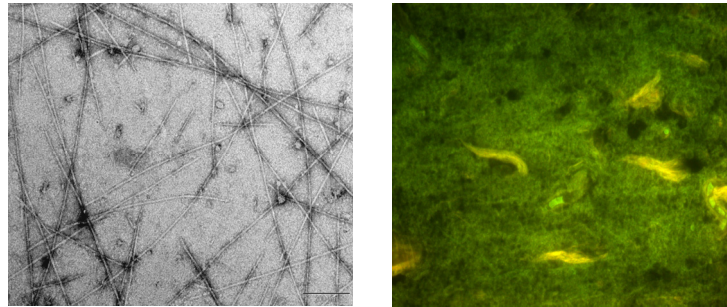
Verabreichung von spezifischen NSAID-Enantiomeren, die keine COX-1/2 Inhibition aufweisen, diskutiert. Tarenflurbil (oder (*R*)-Flurbiprofen bzw. Flurizan<sup>®</sup>, **46**, entwickelt von Myriad Pharmaceuticals), weist im Gegensatz zu (*S*)-Flurbiprofen keine COX-1-Inhibition auf, ist aber ebenso potent in der Reduktion von A $\beta$ <sub>42</sub> *in vitro* und *in vivo*.<sup>[192, 197]</sup> Die Phase 3-Studie wurde kürzlich abgeschlossen. In der Dosierung von 800 mg/d konnte Tarenflurbil zwar die Verschlechterung in den Aktivitäten des täglichen Lebens und in der Globalfunktion verlangsamen, jedoch war ein signifikanter Einfluss auf die Ergebnisse in den kognitiven Tests nicht erkennbar.

Der Mechanismus der GSIs und GSMs wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. D'Adamio *et al.* entdeckten die Membranproteine BRI2 and BRI3 vom Typ-2, die die A $\beta$ -Produktion von APP hemmen. BRI2 interagiert mit APP, reguliert dadurch die APP-Prozessierung und reduziert die A $\beta$ - und AICD-Spiegel. Dabei sind 17 Aminosäuren von BRI2, die dem NH<sub>2</sub>-terminalen Ende von A $\beta$  entsprechen, für die Interaktion entscheidend.<sup>[203]</sup>

Photoaffinitätsstudien mit GSM-Photoproben (z.B. Flurbiprofen) zeigten, dass nicht die Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes markiert werden, sondern APP, APP-CTFs und A $\beta$ . Die Interaktion wurde an den Aminosäuren 28-36 von A $\beta$  lokalisiert, eine Region, die für die Aggregation der Peptidfibrillen verantwortlich ist. Verbindungen, die mit dieser Region interagieren, wirken auch als GSM und einige GSM verändern die Produktion von A $\beta$ -Oligomeren. Mutationen an dieser GSM-Bindungsstelle am APP verändern die Sensitivität des Substrats.<sup>[204]</sup> Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Substratbindung der GSMs zwei therapeutische Wege offen legt: die Veränderung der A $\beta$ <sub>42</sub>-Produktion sowie die Hemmung der A $\beta$ -Aggregation.

#### 1.4 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau

Ein charakteristisches Merkmal in Gehirnen von Alzheimerpatienten ist die Bildung von intrazellulären NFTs, die aus ungeordneten Ansammlungen gepaart helikaler Filamente (*paired helical filaments*, PHF) des Tau-Proteins bestehen (Abb. 17).<sup>[205]</sup>

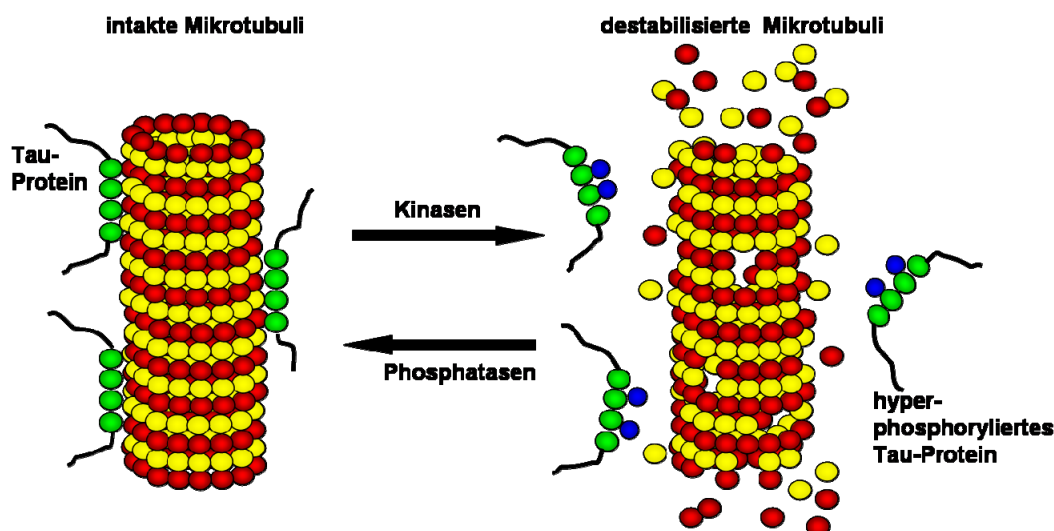


**Abb. 17:** Links: elektronenmikroskopische Aufnahme von Tau-Fibrillen der Hexapeptidsequenz KVQIIN, EMBL Heidelberg. Rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Gehirnschnitts eines Alzheimerpatienten, Tangles angefärbt mit Thioflavin, Klinikum Darmstadt

Das Tau-Protein kann in drei Domänen eingeteilt werden - einem aciden N-Terminus, einem basischen, prolinreichen Mittelteil und einer basischen „repeat“-Domäne am C-Terminus. Es existieren sechs Isoformen mit 352 bis 441 Aminosäuren (ca. 40–50 kDa) im ZNS,<sup>[206, 207]</sup> im peripheren Nervensystem sind Isoformen mit Molmassen von 50–70 kDa vorhanden.<sup>[208]</sup> Die Hauptmenge an Tau ist im Bereich des Axons lokalisiert.<sup>[209]</sup>

Tau zählt zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) und weist mehrere Mikrotubuli-Bindungsdomänen auf. Mikrotubuli bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulindimeren und sind beim Zellteilungsmechanismus sowie bei intrazellulären Transportvorgängen involviert. MAPs stabilisieren die Mikrotubuli und stimulieren die Tubulindimerisierung im Gehirn.<sup>[208]</sup>

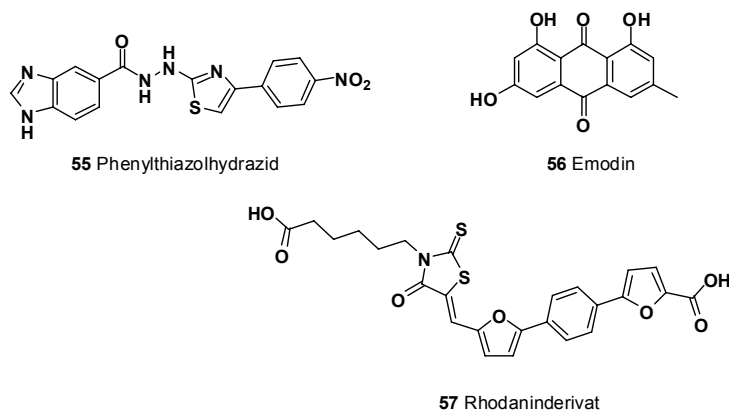
Während der AD bleibt Tau nicht länger an die Mikrotubuli gebunden. Als Folge fallen die Mikrotubuli auseinander, mehrere Tau-Proteine lagern sich zusammen und bilden PHFs, die schließlich zu NFT anwachsen. Die Transportfunktionen können nicht mehr erfüllt werden, was zur Verkümmern und schließlich zum Tod der Nervenzellen führt. Die Lage des Gleichgewichts wird u.a. durch Phosphorylierungen an der Proteinsequenz beeinflusst. Die Phosphorylierung im Mittelteil des Tau-Proteins durch Kinasen (z.B. GSK3) und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen dient dieser Regulierung des dynamischen Gleichgewichts der Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und dem Tau-Protein (Abb. 18).<sup>[210]</sup> Eine Phosphorylierung an Ser214 und Ser262 führt zu einem drastischen Abfall der Bindungsaffinität zum Mikrotubulus, so dass sich das Protein von Tubulin ablöst.<sup>[211]</sup>



**Abb. 18:** Schematische Darstellung des Mikrotubuli/Tau-Protein-Gleichgewichts

Die Verteilung und Dichte der PHFs korrelieren mit dem Fortschritt von AD,<sup>[212-214]</sup> daher stellt die Entwicklung von Tau-Aggregationshemmern eine mögliche Therapie dar. Zudem existiert ein Zusammenhang zu anderen sogenannten Tauopathien. Diese neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. Frontotemporale Demenz oder Morbus Pick weisen ebenfalls Aggregate des Tau-Proteins auf.

Zu den potentesten Tau-Aggregationshemmern zählen Phenylthiazolhydrazide mit Aktivitäten im niedrigen mikromolaren Bereich.<sup>[215]</sup> Verbindung **55** (Abb. 19) weist für die Aggregationshemmung einen  $IC_{50}$  von  $1.6 \mu M$  und einen  $DC_{50}$  für die Depolymerisation von bestehenden Aggregaten von  $0.7 \mu M$  auf.<sup>[216]</sup> Von Rhodanin abgeleitete Inhibitoren (z.B. **57**) hemmen die Tau-Aggregation in einem Zellmodell reversibel und in nanomolaren Konzentrationen ( $IC_{50} = 0.26 \mu M$ ,  $DC_{50} = 0.16 \mu M$ ).<sup>[217]</sup> Des Weiteren zeigen Phenothiazide<sup>[218]</sup>, Anthrachinone wie Emodin (**56**)<sup>[219]</sup> sowie von Curcumin abgeleitete Pyrazole und Isoxazole<sup>[220]</sup> eine Hemmung der Tau-Aggregation.



**Abb. 19:** Tau-Aggregationshemmer

## 1.5 Die Rolle von GSK3 in der AD-Pathologie

Proteinkinasen katalysieren die Übertragung von Phosphatgruppen von einem Donor, z.B. ATP, auf Aminosäureseitenketten. Neben der physiologischen Bedeutung in der Insulin-Signalkaskade ist die Proteinkinase GSK3 in weitere Signalübertragungswege involviert. Dysregulierung der GSK3 führt zu Typ-2-Diabetes mellitus<sup>[221, 222]</sup>, AD<sup>[223, 224]</sup>, bipolarer affektiver Störung<sup>[225]</sup>, Krebs<sup>[226, 227]</sup> und zu Entzündungsprozessen.<sup>[228]</sup>

GSK3 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die eine große Verwandtschaft zu den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) aufweist.<sup>[229]</sup> CDKs sind an der Kontrolle des Zellzyklus und der Transkription beteiligt und übernehmen neuronale Funktionen.<sup>[230, 231]</sup> Der N-Terminus von GSK3 besteht aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und aus ein bis zwei  $\alpha$ -Helices, die C-terminale Region hingegen ist aus sechs  $\alpha$ -Helices und zwei  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut. Es existieren zwei Isoformen, GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$ . GSK3 $\alpha$  enthält am N-Terminus einen glycinreichen Rest und ist 4 kDa schwerer als die  $\beta$ -Isoform (47 kDa). Beide Isoformen weisen zwei ATP-Bindungsstellen auf. Innerhalb der Kinasedomäne besteht eine hohe Homologie zwischen den beiden Isoformen (98% Sequenzidentität), jedoch bestehen Unterschiede in der Funktion. Das Entfernen der  $\beta$ -Isoform in Mäusen verursacht schwere Leberschäden durch Hepatozyten-Apoptose und führt zum Absterben des Embryos. Dies kann nicht durch die  $\alpha$ -Isoform kompensiert werden.<sup>[232]</sup> Phosphorylierung von Ser21 (GSK3 $\alpha$ ) oder Ser9 (GSK3 $\beta$ ) führt zu einer Inhibierung der Enzymaktivität, während die Phosphorylierung von Tyr279 (GSK3 $\alpha$ ) oder Tyr216 (GSK3 $\beta$ ) zu einer Aktivierung der Enzymaktivität führt.

Bis heute wurden mehr als 40 Substrate identifiziert, die von GSK3 phosphoryliert werden.<sup>[233]</sup> Diese große Anzahl verdeutlicht das große Potential von GSK3, zeigt aber auch, dass die Aktivität von GSK3 sehr vorsichtig reguliert werden muss. Die Wirkung von GSK3 wird zudem durch den Grad der Phosphorylierung der Substrate beeinflusst.

GSK3 ist stark an der synaptischen Plastizität, also der Bildung, Versorgung und Verstärkung der Synapsen beteiligt. Die erhöhte GSK3 $\beta$ -Expression in Gehirnen von AD-Patienten korreliert mit der Zunahme der NFT-Bildung sowie der kognitiven Verschlechterung.<sup>[234, 235]</sup> Die erhöhte GSK3-Aktivität verursacht die Phosphorylierung des Tau-Proteins (Abb. 20) und induziert somit die Abspaltung von den Mikrotubuli. Auch andere Substrate von GSK3 werden phosphoryliert und so in ihrer Funktion gehemmt, z.B.  $\beta$ -Catenin, das an PS1 binden kann. Die Phosphorylierung von APP an T668 bewirkt seine amyloidogene Prozessierung. Phiel *et al.* zeigten, dass GSK3 eventuell auch die Spaltung der APP-CTFs regulieren könnte.<sup>[224]</sup>



Erste Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von geeigneten GSK3-Inhibitoren liegen vor: GSK3-Inhibition führte zu einer Abnahme der A $\beta$ -Produktion *in vivo*, wobei der exakte Mechanismus unklar ist.<sup>[224]</sup> Beobachtungen, dass C-terminale Fragmente des APP unter Einwirkung von GSK3-Inhibitoren akkumulieren, sprechen für eine Beeinflussung der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität. Untersuchungen an APP-transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Inhibition der GSK3 zu neuroprotektiven Effekten führt, was die Relevanz von GSK3-Inhibitoren bei der Therapie von AD unterstreicht.<sup>[236]</sup>

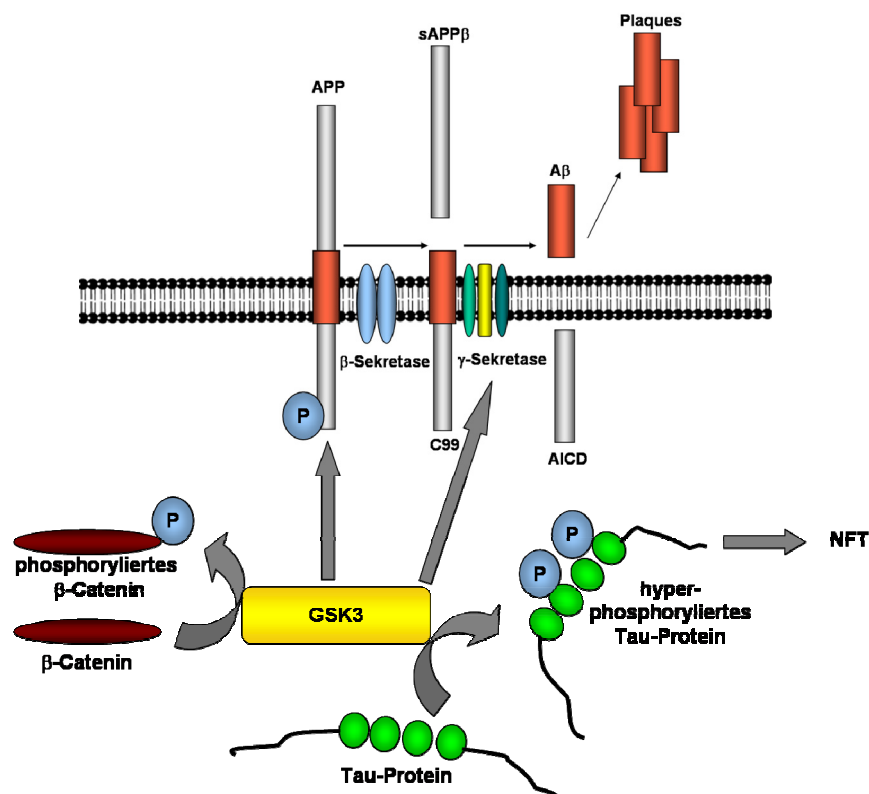


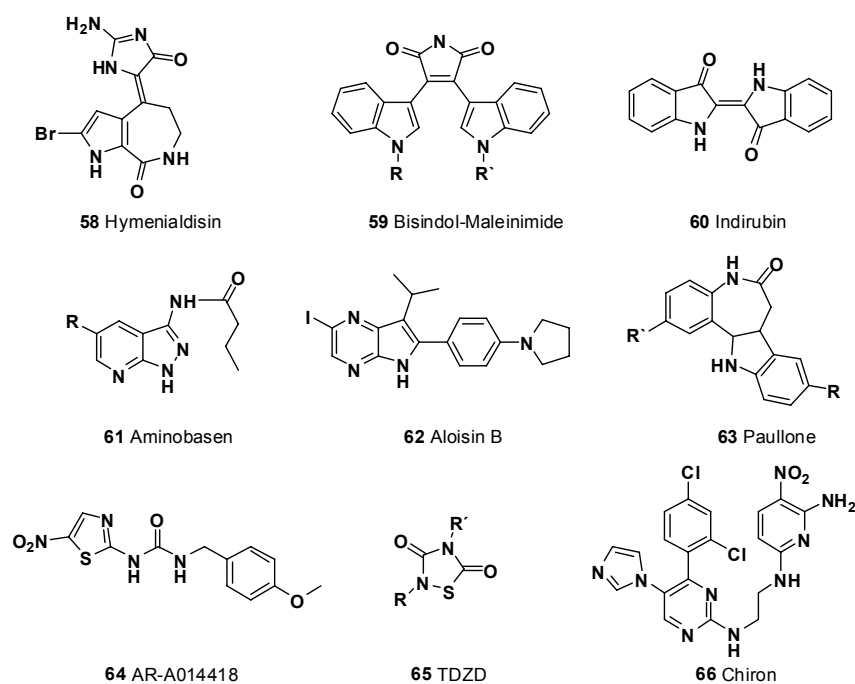
Abb. 20: Die Rolle von GSK3 in AD

### 1.5.1 GSK3-Inhibitoren

In der Literatur sind zahlreiche GSK3-Inhibitoren bekannt, jedoch ist die selektive Inhibition gegenüber anderen Kinasen eine große Herausforderung. Da die Kristallstruktur von GSK3 bekannt ist, bietet sich ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign für die Entwicklung potenter und selektiver Wirkstoffe an. Einer der ersten GSK3-Inhibitoren ist Lithium, welches lange als Therapeutikum bei bipolarer Affektivitätsstörung eingesetzt wurde. In neuerer Zeit sind eine Reihe von Substanzen entwickelt worden, die eine gute Aktivität mit zunehmender Selektivität aufweisen. Die meisten dieser Verbindungen wirken ATP-kompetitiv.

Hymenialdisin (**58**, Abb. 21) ist marinen Ursprungs und ein Multikinase-Inhibitor mit Präferenz für verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe. Neben hoher Affinität für CDK1 ( $IC_{50} = 22$  nM) und CDK5 ( $IC_{50} = 28$  nM) wird GSK3 $\beta$  mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 10 nM am stärksten gehemmt.<sup>[237]</sup> Erste Verbindungen, die die GSK3 im submikromolaren Bereich hemmen, waren Maleinimide wie **59**.<sup>[238, 239]</sup> Die planaren Idirubine wie **60** sind potente und selektive Inhibitoren der Kinasen GSK3 und CDK5 und inaktiv in Bezug auf die verwandte *extracellular signal-regulated kinase 2* (ERK2). Sie inhibieren die GSK3-vermittelte Tau-Phosphorylierung *in vitro* ( $IC_{50} = 100$  nM).<sup>[240]</sup>

Aminobasen (**61**, Abb. 21) wie Pyrazolpyridazine sowie Phenolpyrazolpyridine binden an die hydrophobe Seite der ATP-Bindungstasche und sind z.T. wasserlöslich. Auch Aloisin B (**62**) zeigt eine gute GSK3-Hemmung.<sup>[240, 241]</sup>



**Abb. 21:** Bekannte GSK3-Inhibitoren

Verschiedene Indolobenzazepinone, sog. Paullone (z.B. **63**) zeigen antiproliferative Wirkung auf humane Krebszelllinien und sind potente Inhibitoren von CDK1, CDK5 und GSK3 $\beta$ . Ein Vertreter dieser Klasse, Alsterpaullon, zeigt starke Inhibition für CDK1 ( $IC_{50} = 35$  nM, CDK5 ( $IC_{50} = 40$  nM) und GSK3 $\beta$  ( $IC_{50} = 4$  nM).<sup>[242]</sup> Eine Weiterentwicklung von Alsterpaullon führte zu potenteren (z.B. 2-Cyanoethyl-Alsterpaullon,  $IC_{50}(GSK3\beta) = 800$  pM) und selektiven Derivaten (z.B. 1-Azakenpaullon  $IC_{50}(GSK3\beta) = 18$  nM).

AstraZeneca identifizierte über HTS AR-014418 (**64**), ein Thiazolharnstoffderivat, das GSK3 $\beta$  selektiv hemmt ( $IC_{50} = 100$  nM). Verwandte Kinasen wie CDK2 und CDK5 werden nicht beeinflusst ( $IC_{50} > 100$   $\mu$ M). Diese Selektivität lässt sich durch die Orientierung von AR-014418 in der ATP-Bindetasche erklären. Durch die Nitro-Gruppe treten sterische Hinderungen mit dem Gatekeeper von CDK2 auf. In der GSK3-Bindungstasche toleriert Leu132 diese Ausrichtung und ermöglicht so die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. **64** zeigt zudem neuroprotektive Eigenschaften gegenüber N2A Neuroblastoma-Zellen.<sup>[243]</sup> Die Gruppe der Thiadiazolidinone (TDZD, **65**, Abb. 21) sind die ersten Vertreter von GSK3-Inhibitoren, die nicht ATP-kompetitiv wirken. Auswertungen der Enzymkinetiken und die Hypothese, dass die Verbindung in der GSK3 $\beta$  mit Arg96, Lys205 und Tyr216 der Oxyanion-Bindetasche wechselwirken, waren die Basis für diese Annahme.<sup>[244]</sup> Nachfolgend durchgeführte *Mapping*-Studien zeigten jedoch, dass es auch zur Belegung der ATP-Bindetasche durch Vertreter dieser Verbindungsklasse kommt.<sup>[245]</sup> Ein Kinase-Screening der TDZDs zeigte Präferenz für GSK3 $\beta$ , die im mikromolaren Bereich gehemmt wird. Vertreter der von Chiron hergestellten GSK3-Inhibitoren weisen Pyrimidin- und Pyridin-Teilstrukturen auf, die durch eine Ethylendiamineinheit verbunden sind. CT 98014 (**66**, Abb. 21) inhibiert GSK3 $\beta$  mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 580 pM.<sup>[246]</sup> Neben den vorgestellten Strukturklassen sind zahlreiche heterozyklische Verbindungen mit Aminofurazan- und Triazol-Grundstruktur sowie Benzimidazole und Pyrazolpyrimidine als GSK3-Inhibitoren bekannt.

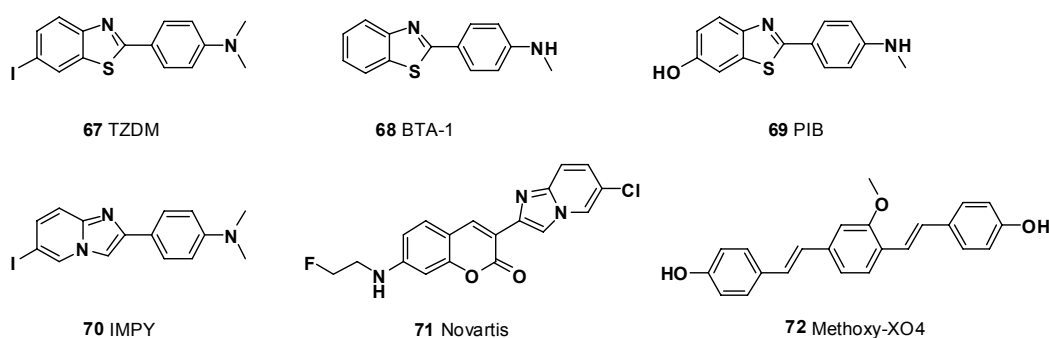
## 1.6 Alzheimer-Diagnostik

Neben der Therapie von AD ist eine frühe Diagnose mittels bildgebender Verfahren von großem Interesse. Hierfür sind Marker notwendig, die den Fortschritt der Krankheit eindeutig zeigen. Die meisten Amyloid-bindenden Farbstoffe unterscheiden nicht zwischen den verschiedenen Protein-Aggregaten A $\beta$ , PHF, PrP<sup>Sc</sup> und  $\alpha$ -Synuclein. Dieser Mangel an Selektivität ist zwar für die Entwicklung von Aggregationshemmern wenig relevant, jedoch für die Entwicklung diagnostischer Marker entscheidend. So müssen Amyloidmarker, die für die Radiodiagnostik der zugehörigen Krankheiten geeignet sind, selektiv nur eine Proteinablagerung anfärben.

Zahlreiche radioaktive bzw. fluoreszierende Verbindungen können  $\beta$ -Falblattstrukturen markieren. Einige Liganden der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zeigen eine erhöhte A $\beta$ -Selektivität versus Tau-PHF; jedoch gibt es keine Tau-PHF selektiven Marker für

die *in vivo*-Bildgebung. Da das Fortschreiten von AD mit der Tau-Aggregation korreliert, sind selektive Tau-PHF-Marker notwendig.

Die Thioflavinderivate 2-4-(Dimethylamino)phenyl)-6-iodbenzthiazol (TZDM, **67**, Abb. 22) und BTA-1 (**68**) weisen hohe Bindungsaffinitäten in *in vitro*-Bindungsstudien auf ( $K_d(\text{A}\beta_{42}) \sim 0.15 \text{ nM}$ ).<sup>[247, 248]</sup> Die etablierte radiodiagnostische Pittsburgh-Probe B (PIB, **69**) zeigt erhöhte Affinität von A $\beta$  versus Tau.<sup>[249]</sup> Auch Imidazopyridine (IMPYs) wie **70** weisen hohe Affinitäten zu Amyloid-Fibrillen auf.<sup>[250]</sup> Die Novartis-Proben (z.B. **71**) bieten zusätzliche Verwendung für *in vitro*-Experimente, da sie fluoreszierende Cumarine in die amyloid-spezifischen Liganden binden.<sup>[251]</sup> So lassen sich angefärbte Gehirnschnitte mit Bildern der PET- oder SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) vergleichen. Versuche an der Universität Zürich schlugen allerdings aufgrund von schlechten pharmakologischen Eigenschaften wie hoher Lipophilie fehl. Die fluoreszierende Probe Methoxy-XO4 (**72**) markiert sowohl A $\beta$ - als auch Tau-PHF-Aggregate.<sup>[252]</sup> Neue, selektive Proben sind daher notwendig, um die Ablagerungen der Tau-Proteine zu erkennen und sie von den A $\beta$ -Aggregaten zu unterscheiden.



**Abb. 22:** Amyloid-bindende Strukturen

## 2. Zielsetzungen

Nach dem bisherigen Stand der Forschung ist die Inhibition bzw. Modulation der  $\gamma$ -Sekretase ein viel versprechender Ansatz für die Therapie der Alzheimerkrankheit, da sowohl die Stimulation der  $\alpha$ -Sekretase als auch die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase insbesondere durch die gleichzeitige Beeinflussung der Myelinisierung von Nervenzellen zu Nebenwirkungen führen würden.<sup>[253]</sup>

Ziel dieser Arbeit ist es daher die selektive Hemmung bzw. Modulation von Presenilin durch peptidische, semi- und nichtpeptidische Strukturen. Konkurrierende Abbauprozesse sollen von den Modulatoren unbeeinflusst bleiben. Nicht-peptidische, zellgängige Verbindungen bieten dabei einen guten Ausgangspunkt. Von bereits bekannten  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren sollen SAR-Studien durchgeführt werden, die für das Design neuer, potenter Modulatoren herangezogen werden können. Dabei sollen potentielle Inhibitoren generiert werden, die möglicherweise neuartige oder bekannte, aber modifizierte Wechselwirkungen mit dem Enzym aufweisen. Die Inhibitoren sollen neben einer hohen Aktivität, auch eine gute Selektivität und Eigenschaften wie hohe Stabilität oder gute Zellpermeabilität besitzen. Weiterhin ist es wünschenswert, die Bindungsstelle des aktiven Substratkomplexes der  $\gamma$ -Sekretase zu identifizieren. Hierzu sollen Photoaffinitätslabel für Markierungsexperimente dargestellt und Methoden zur Aufreinigung und Analyse des Komplexes entwickelt werden. Parallel zu diesen Arbeiten dienen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für das Design und die Synthese von neuartigen Inhibitoren.

Als zweite Strategie für eine Kausaltherapie von AD wird die direkte Hemmung der Fibrillenbildung durch kleine, organische Verbindungen untersucht. Die Bildung von A $\beta$ -Ablagerungen ist ein zentrales Ereignis in der Pathologie der Amyloidosen. Verbindungen mit hoher Affinität zu  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen können fibrilläres A $\beta$ -Peptid auflösen, indem sie mit den Peptidstrukturen wechselwirken. Für das Auffinden von Strukturen mit anti-amyloidogenen Eigenschaften soll ein Modellassay entwickelt und optimiert werden. Weiterhin sollen die Verbindungen daraufhin untersucht werden, ob sie den Prozess der Bildung der Ablagerungen in einem frühen Stadium unterdrücken können und damit die Entstehung der als „Auslöser“ betrachteten Oligomere von A $\beta$ -Aggregaten unterdrücken. Die identifizierten Verbindungen werden durch DMPK- und SAR-Studien auf ihre Wirkstofffähigkeit hin untersucht und optimiert.

Die Tau-Theorie geht davon aus, dass das Tau-Protein für die Alzheimer Krankheit verantwortlich ist. Als niedermolekulares Phosphoprotein bindet es in Zellen an Mikrotubuli und reguliert deren Zusammenbau in filamentäre Strukturen. Dabei werden die einzelnen Tau-Proteine über ihre sich wiederholenden Abschnitte miteinander verknüpft und das N-terminale Ende wird abgeschnitten. Eine abnorme Hyperphosphorylierung der gepaarten helikalen Tau-Filamente (PHF) führt zu einem nicht mehr funktionellen Protein, welches nicht mehr mit den Mikrotubuli interagieren kann. Als Folge dieser pathologischen Veränderungen können die PHF-Ablagerungen als neurofibrilläre Läsionen in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten beobachtet werden. Ausgewählte Verbindungen sollen auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die Zusammenlagerung von Tau-Proteinen in PTHs zu unterbinden.

Die Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die ursprünglich für ihre Rolle bei der Regulation des Glykogen-Metabolismus identifiziert wurde. Abgesehen davon, dass sie in der Insulin- und IGF-1-vermittelten Signaltransduktion involviert ist, wird sie stark im Gehirn exprimiert, und viele Hinweise deuten darauf hin, dass GSK3 mit der PHF-Tau-Hyperphosphorylierung, der A $\beta$ -induzierten Neurotoxizität, PS1-Mutationen, der  $\beta$ -Catenin-Stabilität/Signalwirkung sowie der A $\beta$ -Bildung verknüpft ist. Dies lässt vermuten, dass die Deregulation von GSK3 eine Hauptrolle bei der Pathogenese der Alzheimerkrankheit spielen könnte und als Folge ist GSK3 $\beta$  als therapeutisches Target für die Alzheimerkrankheit und andere ZNS-Krankheiten hervorgetreten. Publierte Röntgenstrukturanalysen von GSK3-Inhibitorkomplexen erleichtern das rationale Design neuer Hemmstoffe. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es ausgehend von diesen Erkenntnissen potente und selektive GSK-3-Inhibitoren zu entwickeln und zu optimieren. Die Synthese soll von Studien der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und durch *molecular modelling* begleitet werden. Im Abschluss folgt die Profilierung der GSK3-Inhibitoren mittels Aktivitätsuntersuchungen.

Die Diagnostik der Alzheimer Demenz beschränkt sich meist auf die A $\beta$ -Ablagerungen und erfolgt noch immer *post mortem*. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist demnach die Entwicklung und Untersuchung von hirngängigen, Tau-selektiven Markern, die eine zeitnahe PET-Diagnostik ermöglichen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Zur Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase werden peptidische, semi-peptidische und nicht-peptidische Substanzen hergestellt und nachfolgend auf ihre Aktivität hin untersucht. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Synthese von Thiazolylaminen, -amiden und -harnstoffen. Im Laufe der Strukturoptimierung werden die Substanzen hinsichtlich weiterer Funktionalitäten diversifiziert, um verbliebende Selektivitäts- und Aktivitätseigenschaften bezüglich der Hemmung der A $\beta$ -Sekretion zu erzielen. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Entwicklung von Fenofibrat-abgeleiteten Verbindungen. Zudem werden Strukturen hergestellt, die zur Aufklärung des Bindungsmodus dienen können, indem sie die beteiligten Aminosäuresequenzen des Enzyms indentifizieren.

Zur Identifizierung potentieller Aggregationsinhibitoren steht neben der Entwicklung von neuen, hirngängigen Strukturen der Aufbau eines schnell durchzuführenden *in vitro* Assays im Vordergrund, in dem die Eigenschaften der Inhibitoren bezüglich ihrer Selektivität gegenüber unterschiedlichen Proteinablagerungen untersucht werden sollen. Ebenso zentral ist die Erforschung und Optimierung ihrer Synthese. Zusätzlich werden die Verbindungen bezüglich ihrer AD-assozierten Wirkungen betrachtet.

Bei der Entwicklung von GSK3-Inhibitoren stehen besonders das Design neuer Leitstrukturen sowie der Aktivitätsvergleich mit bereits existierenden Verbindungen im Vordergrund. Durch die Einführung von diversen Funktionalitäten soll eine Aktivitätssteigerung erreicht werden. Zudem sollten die Wechselwirkungen mit dem Enzym GSK3 untersucht werden.

Beim Einsatz von diagnostischen Markern ist eine Selektivität bezüglich den A $\beta$ - und Tau-Ablagerungen wünschenswert. Dazu müssen Verbindungen identifiziert werden, die unterschiedliche Affinitäten gegenüber diesen Ablagerungen aufweisen. Die entwickelten Marker mit Fluoreszenzeigenschaften sollen mittels Fluoreszenzmikroskopie an humanem Gewebe getestet werden.

Im folgenden Aschneitt wird zunächst einleitend auf die unterschiedlichen Zielstrukturen eingegangen, auf welchen die Auswahl der im Laufe dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren basiert. Anschließend folgt die genaue Beschreibung ihrer Synthesen und schließlich die Diskussion der in den jeweiligen Assays gewonnen Aktivitätsdaten.

### 3.1 Peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

#### 3.1.1. Einleitung

Presenilin stellt die Untereinheit des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes dar, die die intramembrane Spaltung des APP, den letzten Schritt bei der Bildung der A $\beta$ -Peptide, katalysiert. Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase eignen sich zur Therapie von AD, da sie die Produktion der A $\beta$ -Peptide hemmen und damit die AD-Kaskade unterbinden. Haass und Mitarbeiter zeigten, dass die Signalpeptid-Peptidase (SPP) – ebenfalls eine Aspartylprotease vom Presenilin-Typ – den selben proteolytischen Mechanismus aufweist wie die  $\gamma$ -Sekretase.<sup>[254]</sup> SPP katalysiert die in der Membran stattfindende Spaltung von Signalpeptiden im ER. Dem Enzym kommt bei der Immunabwehr eine entscheidende Rolle zu. Weiterhin wird SPP vom Hepatitis C Virus abgebaut und für die Prozessierung der Komponenten des Virus verwendet. Daher stellt das Enzym ein Target für die anti-infektive Beeinflussung dar. SPP und Presenilin weisen identische Sequenzen im aktiven Zentrum auf und katalysieren intramembrane Spaltungen. Weihhofen und Mitarbeiter berichteten, dass bekannte Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase auch wirksam SPP inhibieren. Die Studien zeigten weiterhin, dass einige Substanzen eine unterschiedliche Selektivität für die beiden Enzyme aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass selektive Inhibitoren für die A $\beta$ -Produktion entwickelt werden können ohne dabei andere in der Membran wirkende Aspartylproteasen zu hemmen. Ein solcher selektiver Inhibitor ist der Cystein-Protease-Inhibitor 1,3-Di-(*N*-carboxybenzoyl-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone [(Z-LL)<sub>2</sub>-Keton], welcher in Abb. 23 dargestellt ist. Studien zeigten, dass die (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton-sensitive Spaltung in der hydrophoben Transmembranregion des Signalpeptids erfolgt und so die Freigabe des N-terminalen Fragments in das Cytosol bewirkt.

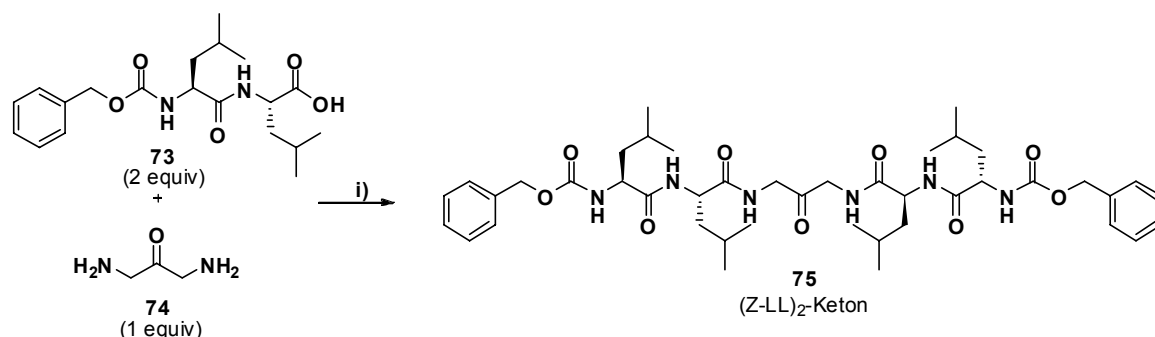
In Anlehnung an die Struktur von Z(Leu-Leu)<sub>2</sub> sollten weitere dipeptidische Strukturen synthetisiert werden und auf ihre Aktivität getestet werden. Die Strukturen sollten weiterhin biotinyliert werden, um mittels Affinitätschromatographie – durch Ausbildung eines starken Streptavidin-Biotin-Komplexes – Informationen über die Bindungsstelle zu erhalten. Der Einbau des Biotins soll dabei die Aktivitäten der Strukturen nicht negativ beeinflussen.

#### 3.1.2 Synthesen

Die Synthesen der Zielstrukturen erfolgt in Anlehnung an die Literatur<sup>[255]</sup> (s. Abb. 23). Der Inhibitor (Z-LL)<sub>2</sub> wird mittels Kupplung des kommerziell erhältlichen Z-geschützten Dipeptids Z-LL-OH mit Diaminacetone unter Verwendung des Kupplungsreagenzes HATU



und Collidin hergestellt. Die Synthese von (Z-LF)<sub>2</sub>-Keton wurde mit dem Z-geschützten Dipeptid Z-LF-OH durchgeführt (Tabelle 1). Parallel werden die Alkohole **73** und **74** unter Verwendung von 1,3-Diaminopropan-2-ol hergestellt (Tabelle 1).



**Abb. 23:** Synthese des symmetrischen (Z-LL)<sub>2</sub>-Ketons. *Reagenzien und Bedingungen:* i) HATU, Collidin in DMF.

**Tabelle 1:** Hergestellte (Z-LL)<sub>2</sub>- und (Z-LF)<sub>2</sub>-Ketone und (Z-LL)<sub>2</sub>- und (Z-LF)<sub>2</sub>-Hydroxide

Verbindung	Dipeptid	Aminkomponente	Ausbeute (%)	HPLC-Reinheit (%)
(Z-LL) <sub>2</sub> -Hydroxid	Z-LL-OH	1,3-Diaminopropan-2-ol	87	92
(Z-LF) <sub>2</sub> -Hydroxid	Z-LF-OH	1,3-Diaminopropan-2-ol	70	94
(Z-LL) <sub>2</sub> -Keton	Z-LL-OH	Diaminaceton	62	96
(Z-LL) <sub>2</sub> -Keton <sup>a</sup>	Z-LL-OH	1,3-Diaminopropan-2-ol	87	95
(Z-LF) <sub>2</sub> -Keton	Z-LF-OH	Diaminaceton	56	89

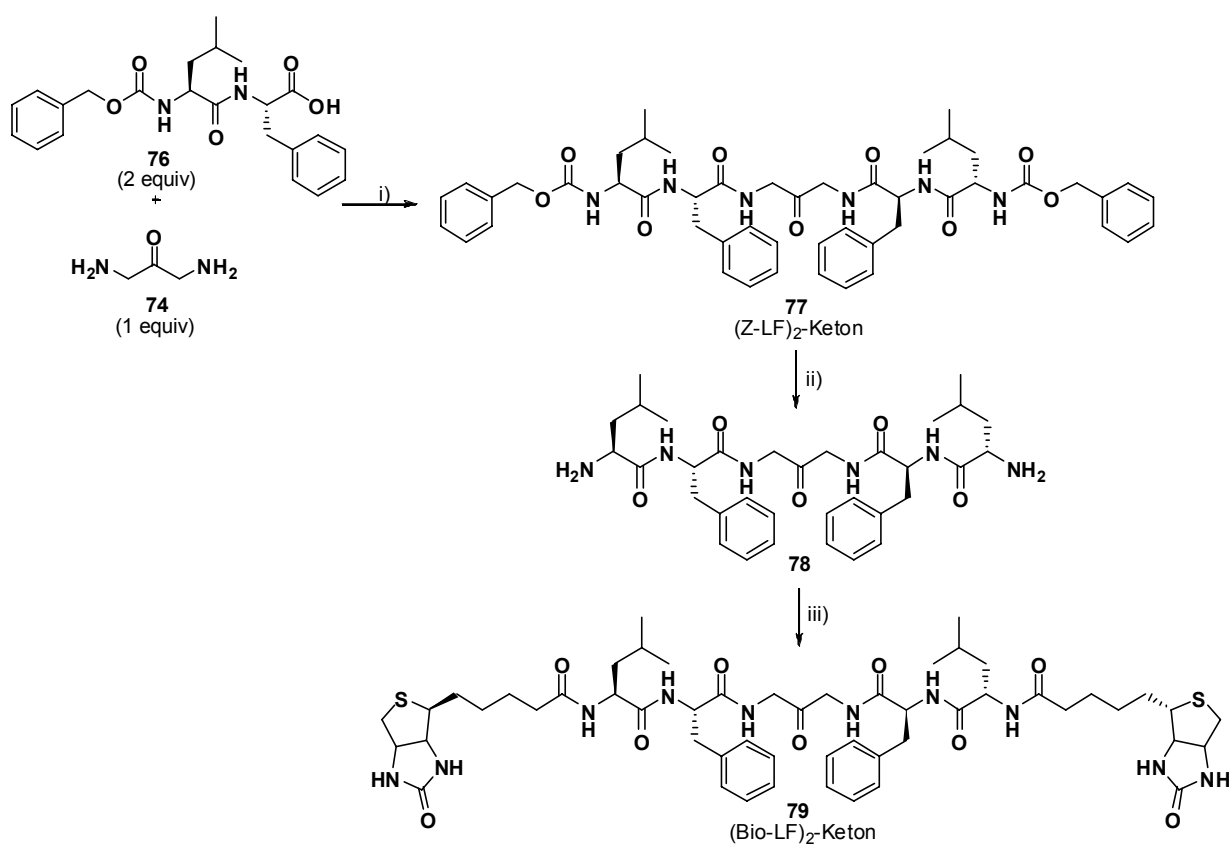
<sup>a</sup> Oxidation des (ZLL)<sub>2</sub>-Hydroxids mit IBX.

Die Kupplung von 1,3-Diaminopropan-2-ol mit Z-LL-OH bzw. mit Z-LF-OH gelang insgesamt in besseren Ausbeuten als die Kupplung mit Diaminoaceton. Um die Ausbeute der Ketonsynthese zu verbessern, wurde daher eine andere Syntheseroute untersucht. Das in sehr guten Ausbeuten erhaltene (Z-LL)<sub>2</sub>-Hydroxid wurde mittels IBX in DMSO zum (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton quantitativ oxidiert.

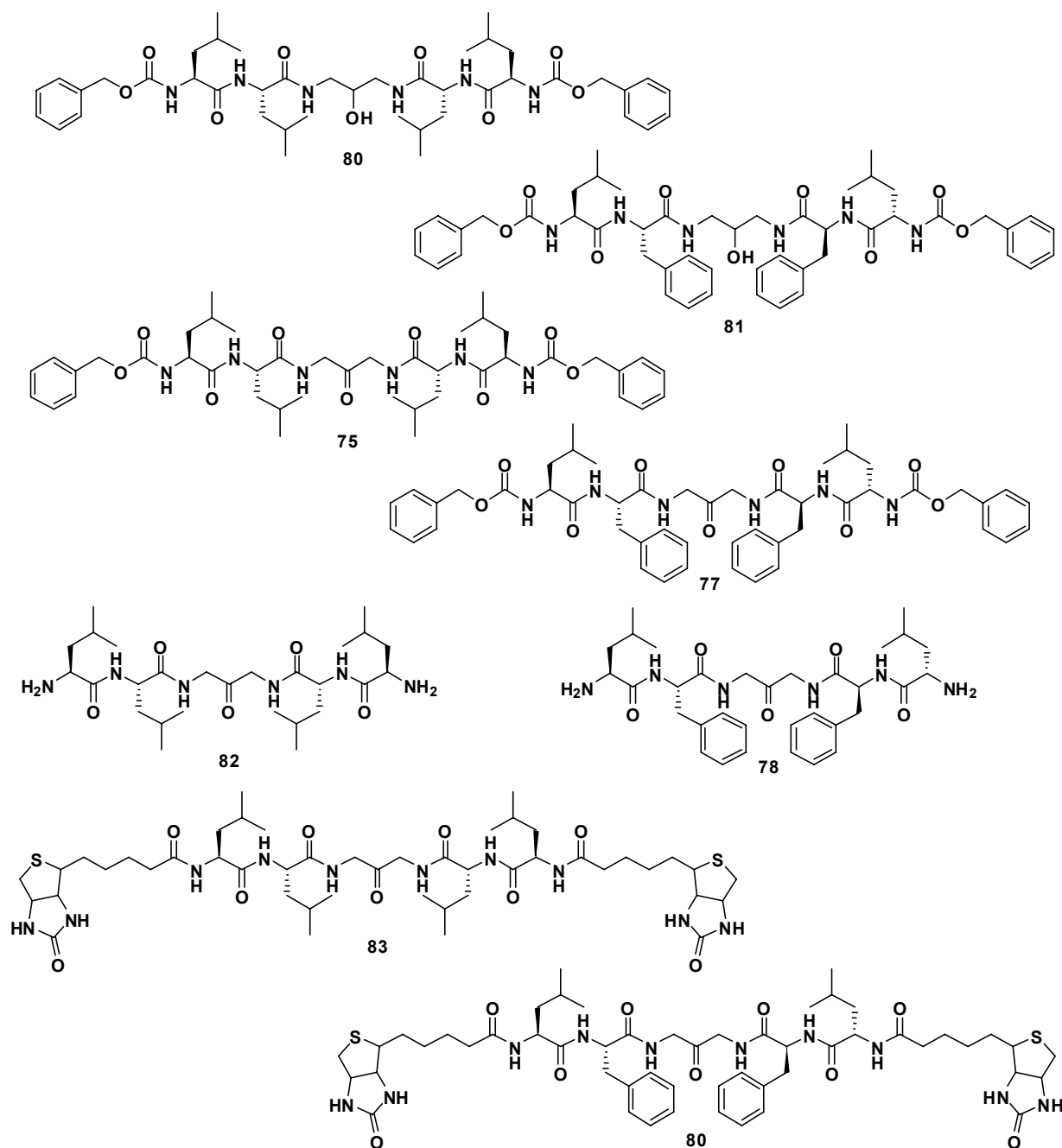
Um die Verwendung des teuren Kupplungsreagenz HATU zu umgehen, wurden Versuche mit anderen Kupplungsreagenzien unternommen. So konnten das (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton auch mit den Reagenzien EDAC/HOBt, DCC, PyBop und PyBrop hergestellt werden, jedoch in schlechtere Ausbeuten als mit HATU/Collidin. Eine plausible Erklärung läge in der sterischen Hinderung.

Die Verbindungen wurden durch NMR- und Massenspektroskopie charakterisiert. Mittels HPLC wurde die Reinheit der Verbindungen ermittelt (s. Tabelle 1).

Zur Herstellung der Biotinderivate (Bio-LL)<sub>2</sub> und (Bio-LF)<sub>2</sub> wurde die Z-Schutzgruppe der (Z-LL)<sub>2</sub>- und (Z-LF)<sub>2</sub>-Ketone mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff entfernt und die quantitativ erhaltenen Amine mit D-Biotin, HATU, DMAP und Collidin umgesetzt (s. Abb. 24). Durch eine säulenchromatographische Aufreinigung konnten die biotinylierten Verbindungen in moderaten Ausbeuten isoliert werden [(Bio-LL)<sub>2</sub>: 66%, (Bio-LF)<sub>2</sub>: 45%]. Die Substanzen wurden mittels HPLC und NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert.



**Abb. 24:** Synthese der biotinylierten Verbindung (Bio-LF)<sub>2</sub>-Keton. *Reagenzien und Bedingungen:* i) HATU, Collidin, DMF; ii) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH; iii) D-Biotin, DMAP, Collidin, DMF.

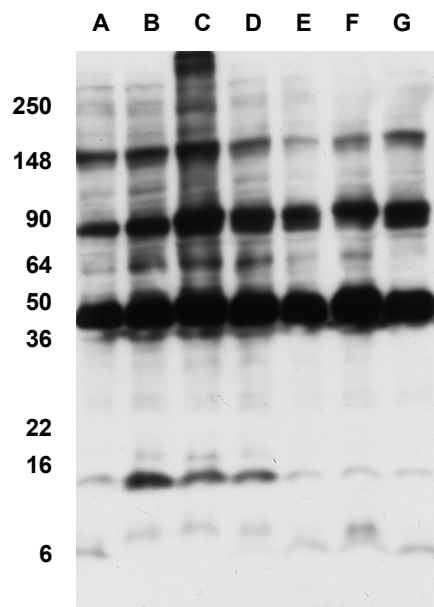


**Abb. 25:** Hergestellte (Z-LL)<sub>2</sub>- und (Z-LF)<sub>2</sub>-Ketone und -Hydroxide, entschützte Amine und biotinylierte Derivate.

### 3.1.3 Biologische Aktivität

Die hergestellten Verbindungen wurden an der LMU München in der Arbeitsgruppe von Christian Haas bezüglich ihrer Hemmwirkung auf SPP getestet. Dazu wurde in einem Membranassay (SPPL 2b; Zellen: sw SPPL 2b wt + TNF $\alpha$  transient) die TNF $\alpha$ -Prozessierung untersucht. Abbildung 26 zeigt das Schägger-Gel und die Detektion der Spaltprodukte der Verbindungen 73–76. Betrachtet wird dabei TNF $\alpha$ , dessen Volllänge bei ca. 36 kDa, das N-

terminale Fragment bei knapp unter 16 kDa und das Produkt der SPPL2 $\beta$ -Spaltung (ICD) bei knapp über 6 kDa zu sehen ist. Liegt ein potenter Inhibitor vor, wird das NTF akkumuliert und die Produktion von ICD ist gehemmt. Zur Kontrolle wurde im Assay kommerziell erhältliches Z(LL)<sub>2</sub> Keton verwendet (Probe A).



**Abb. 26:** **A)** 4,5  $\mu$ l DMSO; **B)** (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton 30  $\mu$ M (Kontrolle); **C)** Z-LL<sub>2</sub>-Keton biotinyliert 30  $\mu$ M (**79**); **D)** (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton 30  $\mu$ M (**75**); **E)** (Z-LF)<sub>2</sub>-Keton 30  $\mu$ M (**76**); **F)** (Z-LL)<sub>2</sub>-Hydroxid 30  $\mu$ M (**74**); **G)** (Z-LL)<sub>2</sub>-Hydroxid 30  $\mu$ M (**73**). Abb. mit freundlicher Genehmigung von R. Fluhrer.

Die auf dem Gel erkennbaren Fragmente zeigen, dass das (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton sowie das biotinylierte Derivat die Spaltung des Enzyms hemmen. Die schwache existierende ICD-Bande weist darauf hin, dass keine vollständige Hemmung des Enzyms, jedoch eine starke Beeinträchtigung der Katalysegeschwindigkeit vorliegt. Dass (Z-LF)<sub>2</sub>-Keton, das (Z-LF)<sub>2</sub>-Hydroxid sowie (Z-LL)<sub>2</sub>-Hydroxid führten zu keiner Hemmung des Enzyms. Weitere Untersuchungen wurden nicht mehr verfolgt und der weitere Schwerpunkt wurde auf die Entwicklung von semi- und nicht-peptidischen Inhibitoren gelegt.

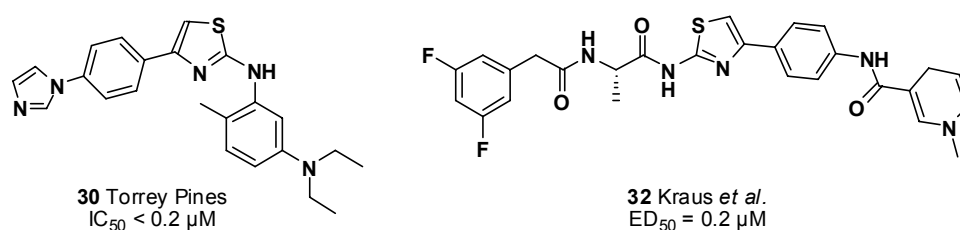
### 3.2 Semi- und nicht-peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren

#### 3.2.1 Thiazolylamide und -amine als $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren

Im Jahr 2004 stellte Torrey Pines Therapeutics (früher Neurogenetics) ein Patent mit einer Vielzahl von Thiazolylaminderivaten mit  $A\beta_{40/42}$ -senkender Aktivität vor.<sup>[178]</sup> Die  $IC_{50}$ -Werte der potentesten Verbindungen liegen bei 0.2  $\mu M$  (z.B. **30**, Abb. 27). Auffällig ist, dass die aktivsten Verbindungen einen Imidazolring als Substituenten tragen. Des Weiteren stellte das Unternehmen die Serie NGX555 als  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren mit Aktivitäten im niedrigen nanomolaren Bereich vor; allerdings wurden die Strukturen bisher nicht veröffentlicht. Die Verbindungen aus dieser Serie binden laut Unternehmenshypothese an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex und regulieren nach einem allosterischen Mechanismus die  $A\beta$ -Spaltung zu erhöhten  $A\beta_{37/38}$ -Konzentrationen, ohne dabei die katalytische Aktivität des Komplexes zu beeinträchtigen. Die veränderten Verhältnisse von den  $A\beta$ -Isoformen und  $A\beta_{total}$  ( $IC_{50}(A\beta_{42}) = 10$  nM,  $IC_{50}(A\beta_{40}) = 64$  nM, SY5Y-Zellen), sowie die erhaltene Notch- und E-Cadherin-Prozessierung unterstützt die Einordnung von NGX97555 als GSM. Ähnliche Änderungen der Verhältnisse der  $A\beta$ -Isoformen wurden *in vivo* beobachtet (25–50 mg/kg, 3 d). NGX97555 ist vermutlich ein naher Verwandter der Verbindung **30**.<sup>[181]</sup> Y. Laras et al. stellten das substituierte Thiazolylamid **32** ( $IC_{50} = 0.2$   $\mu M$ ) vor, das mit einem hydrophoben Dihydropyridin-Motiv ausgestattet ist. Diese Struktureinheit stellt ein sogenanntes *redox chemical delivery system* (RCDS) dar und dient zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften.<sup>[182]</sup> Es wurde gezeigt, dass die Verbindung **32** nach 30 Minuten dreimal schneller die Blut-Hirn-Schranke überwindet als die entsprechende Verbindung ohne den RCDS-Rest. Im Gehirn wird das Dihydropyridin-Motiv enzymatisch zum entsprechenden ionischen Pyridiniumsalz oxidiert. In dieser Form kann die Verbindung die Blut-Hirn-Schranke nicht wieder überschreiten.<sup>[256]</sup> Die effektive Konzentration der entsprechenden Substanz wird auf diese Weise am Wirkort erhöht, weshalb kleine Dosierungsmengen oft als ausreichend erscheinen. Mögliche Nebenwirkungen werden somit reduziert.

Thiazolylamide und -amine stellen aufgrund ihrer guten Bioverfügbarkeit eine interessante Alternative zu peptidischen und semipeptidischen Verbindungen dar. Da die resultierenden Thiazole in genereller Hinsicht interessante und häufig verwendete Bausteine in der Wirkstoffsynthese darstellen, werden die Untersuchungen auf weitere Funktionalitäten ausgeweitet. Für die geplante SAR-Analyse des Thiazolylamins **30** und des Thiazolylamids

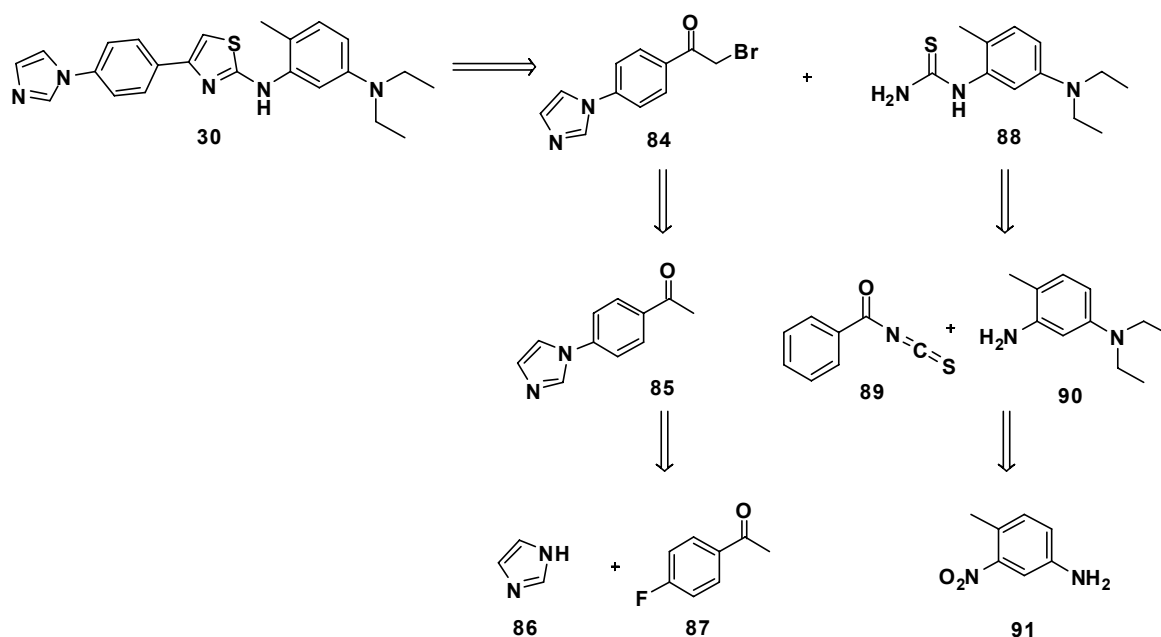
**32** (Abb. 27) sowie für die Untersuchung der biologischen Aktivität in einem *in vitro* Test war es zunächst erforderlich, diese hochaktiven  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren zu synthetisieren. Im Folgenden werden diese Synthese vorgestellt und erste Modifizierungen des Grundgerüsts diskutiert, welche zeitgleich mit der vorgestellten SAR-Analyse durchgeführt wurden. Die Rolle des Imidazolrings auf die Aktivität lässt sich durch Substitution untersuchen. Basierend auf den Ergebnissen der SAR-Studien sollen schließlich neue, potente Thiazole als  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren entwickelt werden.



**Abb. 27:** Strukturen und Aktivitäten der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren **30** und **32**. Verbindung **32** ist mit einer RCDS-Gruppe verknüpft und besitzt ein verbessertes pharmakologisches Profil.

### 3.2.2 Allgemeine Überlegungen und Syntheseplan

Abb. 28 zeigt die Retrosynthese der gewünschten Verbindung **30**. Das Thiazolylamin-Grundgerüst lässt sich aus den Verbindungen **86**, **87** und **91** über etablierte Kupplungs- und Entschützungsreaktionen aufbauen.



**Abb. 28:** Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung **30**

Bei der in Abb. 28 dargestellten retrosynthetischer Betrachtung der Thiazolylamine erscheint es sinnvoll, den Thiazolring so zu zerlegen, dass er über eine Hantzsche Thiazolsynthese ausgehend von einem Bromacetophenonbaustein **84** und einem Thioharnstoffderivat **88** aufgebaut werden kann. Die Reaktion verläuft aufgrund der *hard/hard*-Kombination von Stickstoff und Sauerstoff und der *soft/soft*-Beziehung von Schwefel und Brom mit der erforderlichen Selektivität. Das 1-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)-2-bromethanon **84** lässt sich über eine selektive  $\alpha$ -Bromierung aus dem Acetophenon **85** herstellen. **85** kann ausgehend von Imidazol **96** und 4-Fluoracetophenon **87** über eine  $S_EAr$ -Reaktion erhalten werden. Der Thioharnstoff **88** kann auf einfache Weise über eine Kondensationsreaktion von einem Benzoylisonitril **89** mit verschiedenen Aminobenzolderivaten **90** hergestellt werden. Die Alkylierung des Amins **91** erfolgt mittels Methyljodid; die Reduktion der Nitrofunktion mit Zinn(II)chlorid.

Die Retrosynthese des Thiazolylamids **32** sieht eine ähnliche Reaktionsfolge vor (Abb. 29). Das 2-Thiazolylamin-Hydrobromid **96** resultiert als Produkt einer modifizierten Hantzschen Cyclokondensation aus 1-Brom-4-nitroacetophenon (**97**) und Thioharnstoff (**98**). Das Hydrobromidsalz **96** wurde dann mit der *N*-Boc geschützten Aminosäure (*S*)-Alanin acetyliert. Nach Entfernung der *N*-Boc-Schutzgruppe mittels TFA kann das Amin **94** mit 3,5-Difluorphenylessigsäure (**93**) unter Verwendung eines Kupplungsreagenzes wie EDAC acyliert werden. Durch Reduktion der Nitrofunktion von **92** kann schließlich das Amin **32** erhalten werden.

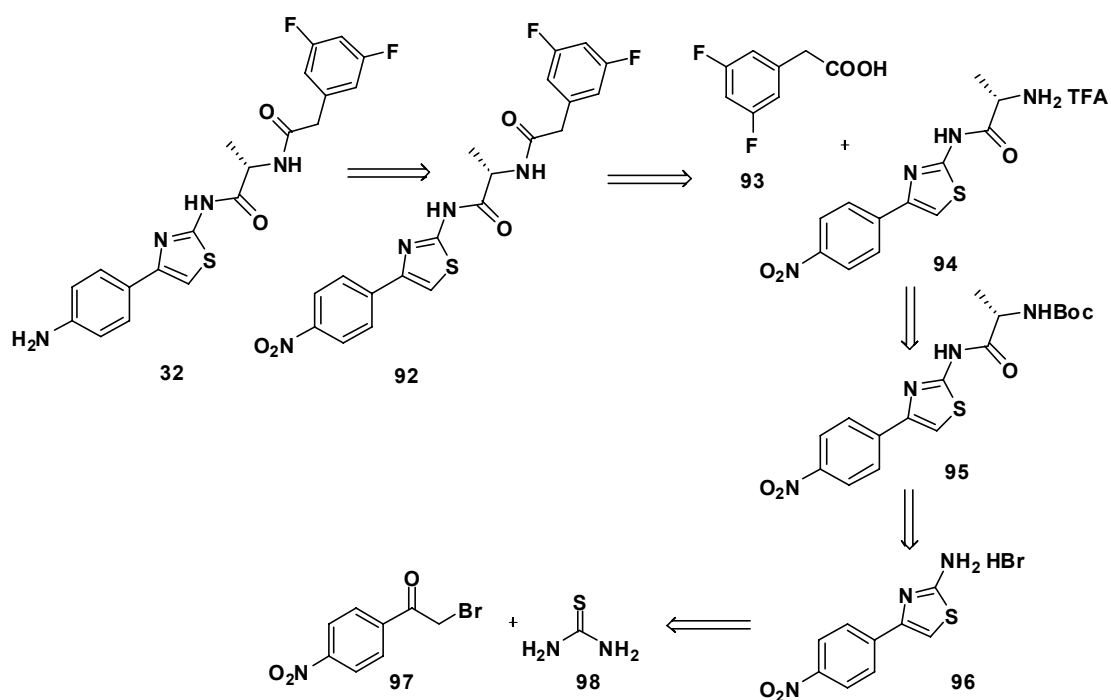


Abb. 29: Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung **32**

Durch den Einsatz von verschiedenen Bromacetophenonen (z.B. 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon) sind weitere Thiazolylamide als potentielle  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren zugänglich.

Neben den bereits bekannten Strukturen **30** und **32** wurden neue Thiazole als  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren aufgebaut. Die Grundstruktur **99** vereint sowohl Strukturmerkmale der Torrey Pines Serie als auch des Thiazolylamids **32** (Abb. 30). An mehreren Stellen im Molekül können Substituenten eingeführt werden, was zu einer Aktivitätssteigerung und zu einer Aufdeckung der beteiligten Wechselwirkungen führen kann. Die Synthese erfolgt wie bei Verbindung **30** über den Aufbau eines imidazolsubstituierten Bromacetophenons (**84**). Der Thiazolring kann wiederum über eine Hantzsche Cyclokondensation aufgebaut werden. Das Harnstoffmotif in **99** ist mittels einer Kondensationsreaktion des Isocyanats **101** mit dem Thiazolylamin-Hydrobromid **100** zugänglich. Zahlreiche Bromacetophenon-Derivate sind kommerziell erhältlich, wodurch eine hohe chemische Variation möglich ist. Ausgehend von Acetophenonen lassen sich somit Bausteine mit variablem Rest einführen. Das Substitutionsmuster des Benzylisocyanats **101** kann ebenfalls variiert werden.

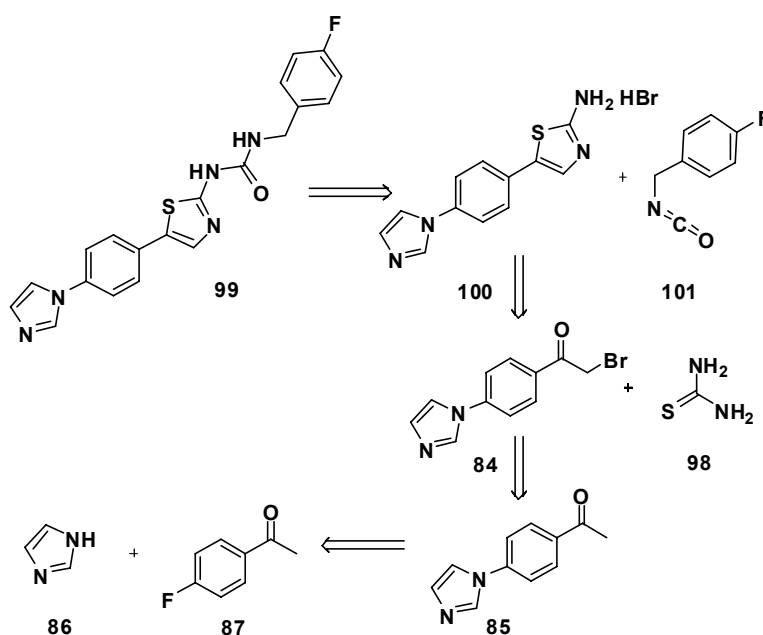


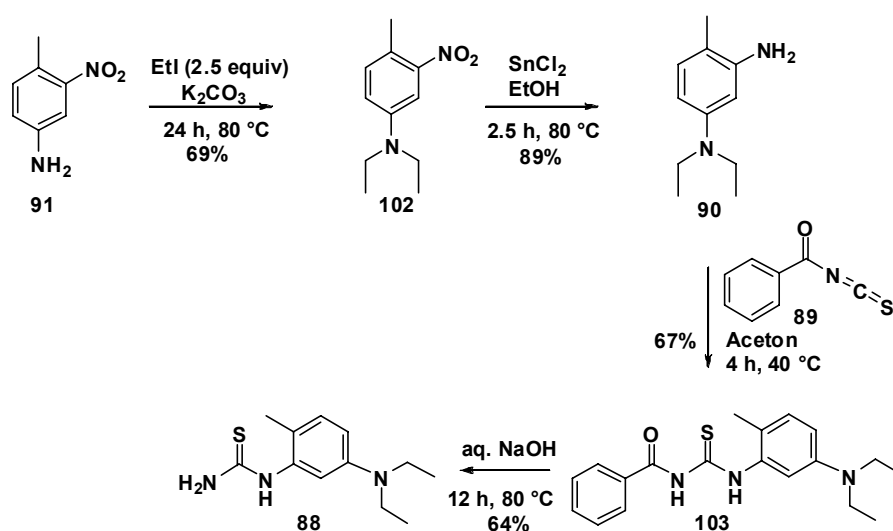
Abb. 30: Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung **99**

### 3.2.3 Synthesen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Synthese der Thiazolylamine (Abb. 28, Kap. 3.2.2) entspricht einer Modifizierung der Patentsynthese.<sup>[178]</sup> Zunächst wurden die Bausteine **88** und **84** separat hergestellt. 4-Methyl-3-nitroanilin **91** (Abb. 31) wurde mit Ethyliodid und



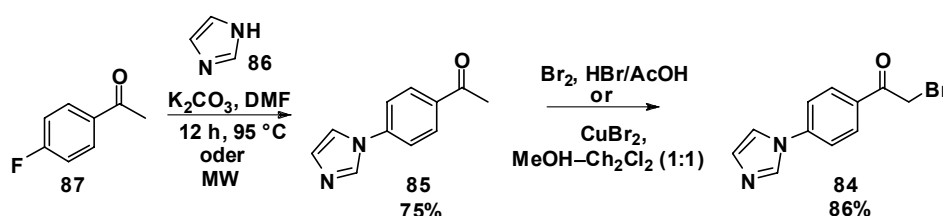
Kaliumcarbonat in DMF bei 80 °C über einen Zeitraum von 24 h zu *N,N*-Diethyl-4-methyl-3-nitroanilin (**102**) alkyliert (Abb. 31). Die Nebenprodukte (mono- und trialkyliertes Produkt) lassen sich säulenchromatographisch leicht abtrennen. Die Ausbeute beträgt 69%. Bei folgender Reduktion von **102** mit Zinn(II)chlorid in Ethanol für 2.5 h bei 80 °C wurde eine Ausbeute von 89% erzielt. Das erhaltene 5-(*N,N*-Diethylamino)-2-methylanilin (**90**) wurde mit Benzoylisothiocyanat in Aceton bei 40 °C über 2 h zu *N*-(5-Diethylamino)-2-methylphenylcarbamothiolbenzamid (**103**) in guten Ausbeuten umgesetzt. Das Thioharnstoff-(5-*N,N*,diethylamino)-2-methylphenylbenzamid (**88**) wurde schließlich mit 10%iger Natronlauge bei 80 °C über Nacht gewonnen.



**Abb. 31:** Synthese des Bausteins **88**

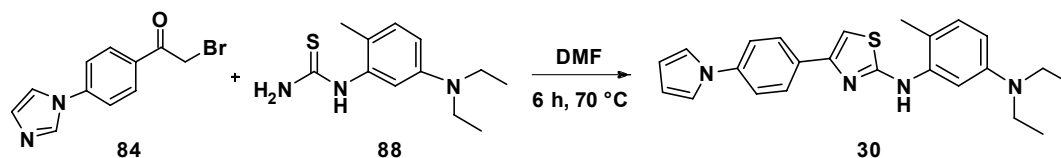
Der Baustein 2-Brom-1-(4-(1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (**84**) wurde separat hergestellt (Abb. 32). Dazu wurde 4-Fluoracetophenon (**87**) mit Imidazol (**86**) und Kaliumcarbonat bei 95 °C in DMF oder DMSO über 72 h zu 1-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)acetone (**85**) umgesetzt. Die Reaktionsmischung wird auf Eiswasser gegeben, wobei das Produkt ausfällt. Falls es nicht zur Fällung kommt, wurde mit Dichlormethan extrahiert. Nach Aufreinigung des Rohprodukts mittels LC (Dichlormethan/Methanol = 9:1) wurde eine Ausbeute von 75% erzielt. Die Reaktion kann auch unter Verkürzung der Reaktionszeit in der Mikrowelle (240 W, 3 min) und oben beschriebener Aufarbeitung durchgeführt werden. Allerdings wurde dabei eine geringere Ausbeute (55%) erzielt. Bei der Bromierung des Acetophenons in  $\alpha$ -Stellung ist die Selektivität der Bromierung zu beachten, da sie in der Regel komplexe Gemische von verschiedenen Produkten ergeben kann. Diese resultieren aus Ringsubstitution, Radikalreaktion oder aus einer Addition an die Enolform der Carbonylfunktion. Zusätzlich wird eine selektive Bromierung der Seitenkette im Fall der aminsubstituierten

Arylmethylketone durch den elektronenschiebenden Effekt der Amingruppe erschwert, der eine Ringbromierung begünstigt. Diwu *et al.* untersuchten verschiedene Bedingungen und Reagenzien zur Bromierung von aminsubstituierten Arylmethylketonen, wobei letztendlich eine zweistufige Bromierungs-, Debromierungsmethode die besten Resultate lieferte.<sup>[257]</sup> Versuche der Bromierung in konzentrierter Schwefelsäure lieferte die Dibromverbindung. Bei der anschließenden Debromierung mit Diethylphosphit und Triethylamin konnte die in der Literaturvorschrift erzielte quantitative Umsetzung allerdings nicht erreicht werden. Das beste Ergebnis mit 86% Ausbeute lieferte die Bromierung mit Brom und 33% Bromwasserstoff in Eisessig. Das monobromierte Produkt fällt als gelber Niederschlag aus der Lösung aus und kann nach Filtration direkt weiter eingesetzt werden. Auch die Bromierung des Methylketons mit  $\text{CuBr}_2$  in siedendem Methanol/Dichlormethan (1:1) führte in guten Ausbeuten zum gewünschten Monoprodukt **84**.



**Abb. 32:** Synthese des Bausteins **84**

Zur Darstellung des Thiazolylamins **30** (Abb. 33) wurden nun die Bausteine **84** und **88** in DMF 6 h bei 70 °C umgesetzt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung auf Eiswasser gegeben und das Produkt wird mit Dichlormethan extrahiert. Durch Reinigung des Rohprodukts mittels LC (Chloroform/Methanol 99:1) wird **30** in 50% Ausbeute erhalten.



**Abb. 33:** Synthese des Thiazolylamins **30**

Durch Variation der Bausteine **84** und **88** können verschiedene Derivate des gleichen Strukturtyps hergestellt werden, deren Einfluss auf die  $\gamma$ -Sekretase untersucht werden können. Die Verbindungen **104–107** (s. Abb. 34) wurden durch den Einsatz von kommerziellen Bromacetophenonderivaten (bei Verbindung **105** und **106**: 1-(4-Azidophenyl)-2-

bromethanon; bei Verbindungen **107** und **108**: 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon) in guten Ausbeuten hergestellt (s. Tabelle 2). Zur Synthese der Verbindungen **30**, **105** und **107** wurde der Baustein **88** und zur Herstellung von **104**, **106** und **108** wurde der kommerziell erhältliche Baustein 4-*N,N*-Diethyl-2-methyl-4-phenylendiamin eingesetzt.

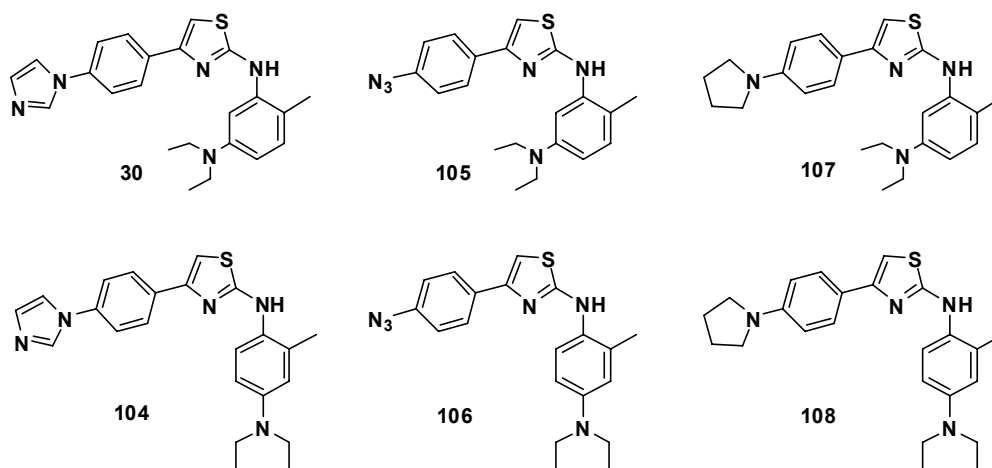


Abb. 34: Strukturen der Thiazolylamine **104–108**

Bei der Entwicklung eines Wirkstoffs müssen die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen beachtet werden. Ein  $\log P \leq 5$  gewährleistet erfahrungsgemäß eine gut orale Verfügbarkeit. Es handelt sich dabei um einen Verteilungskoeffizienten zwischen einem Wasser/*n*-Octanol-Gemisch. Besitzt die Substanz einen Wert mittlerer Lipophilie, so können sowohl hydrophile als auch hydrophobe Phasen durchdrungen werden, um zum Wirkort zu gelangen. Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung, wenn Medikamente oral verabreicht und durch das Blut transportiert werden und gleichzeitig die Blut-Hirn-Schranke passieren sollen. Die tPSA (*topological polar surface area*) stellt ein Maß für die Polarität der Moleküloberfläche dar und ist vom Atomaufbau der Verbindung abhängig. Um die natürliche Barriere zwischen Blut und Hirn übertreten zu können, sollte die tPSA in einem Bereich  $\leq 60 \text{ \AA}^2$  liegen.

Die Lipinski-Regel besagt, dass ein Wirkstoff gute physikochemische Eigenschaften hat, wenn mindestens drei der folgenden vier Bedingungen erfüllt sind:

- Die Zahl der Wasserstoffbrücken-Donatoren ist kleiner als 5.
- Die Zahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren ist kleiner als 10.
- Der berechnete clogP-Wert ist kleiner als 5.
- Das Molekulargewicht ist kleiner als 500 g/mol.

Tabelle 2 fasst die Ausbeuten, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Thiazolylamine **30** und **104–108** zusammen. Die berechneten clogP-Werte liegen bei allen

Verbindungen über dem Wert 5, was darauf hindeutet, dass die Wirkstoffe sehr lipophil sind. Die tPSA-Werte liegen in einem für das Erreichen des Zentralnervensystems geeigneten Bereich.

**Tabelle 2:** Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Thiazolylamine **104–108**

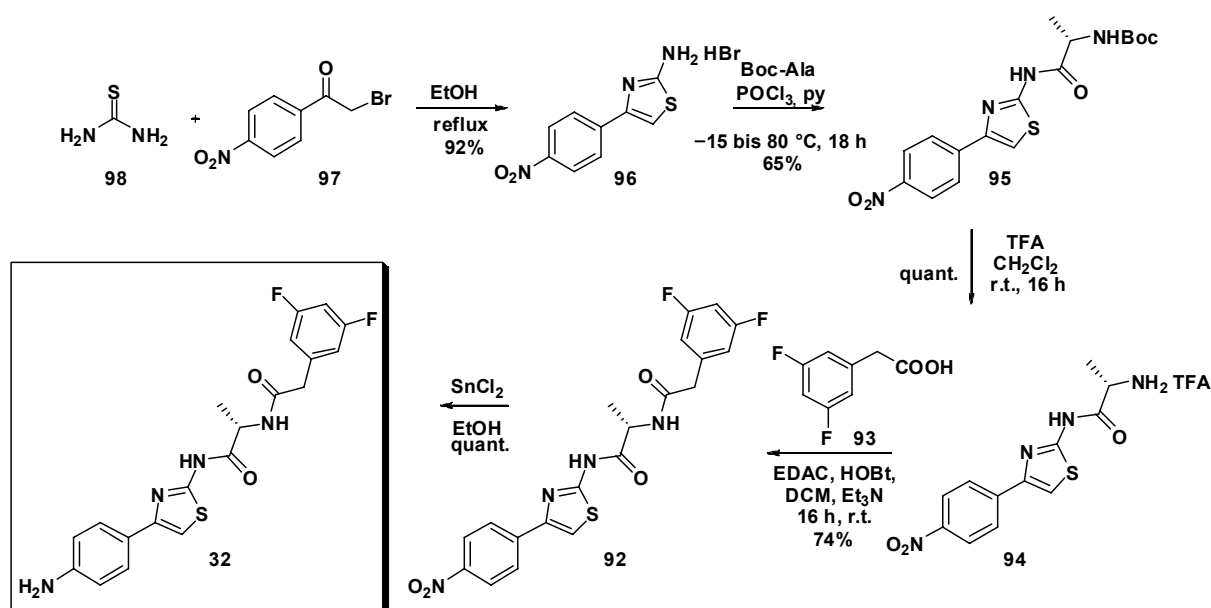
Verbindung	Ausbeute (%) <sup>a</sup>	HPLC Reinheit (%) <sup>b</sup>	clogP <sup>c</sup>	tPSA <sup>c</sup>
<b>30</b>	50	94	6.78	43.23
<b>104</b>	59	96	6.78	43.23
<b>105</b>	96	96	7.43	76.39
<b>106</b>	86	97	7.43	76.39
<b>107</b>	97	94	7.23	30.87
<b>108</b>	80	93	7.23	30.87

<sup>a</sup> Ausbeute der letzten Stufe.

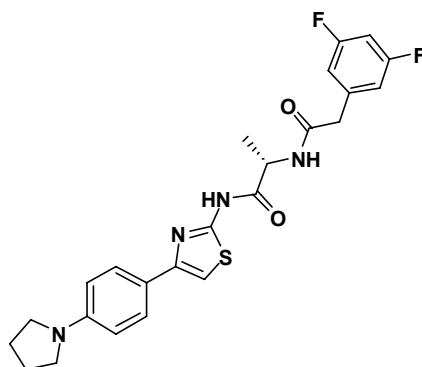
<sup>b</sup> HPLC-Methoden s. Experimenteller Teil.

<sup>c</sup> clogP- und tPSA-Werte berechnet mit Chemdraw.

Die Synthese der Zielstruktur **32** erfolgte in Anlehnung an Y. Laras *et al.*<sup>[182]</sup> und ist in Abb. 35 dargestellt. Das 2-Thiazolylamin-Hydrobromid (**96**) wurde quantitativ über eine Hantzsche Cyclokondensation von 1-Brom-4-nitroacetophenon (**97**) und Thioharnstoff (**98**) in heißem Ethanol erhalten. Das Produkt **96** wurde in hoher Reinheit durch Filtration isoliert und konnte ohne weitere Aufreinigung in den weiteren Syntheseschritten eingesetzt werden. Es folgte die Acylierung durch die *N*-Boc geschützte Aminosäure (*S*)-Alanin. Dabei wurden verschiedene Methoden getestet, wobei konventionelle Peptidkupplungsstrategien nicht anwendbar waren. Klassische Kupplungsreagenzien wie BOP oder DCC/HOBt führten zu schlechten Ausbeuten. Die besten Ergebnisse mit einer Ausbeute von 65% erzielte das nicht-klassische Kupplungssystem Phosphorylchlorid in Pyridin. Der Mechanismus verläuft über ein *in situ* gebildetes Anhydrid der Aminosäure und Phosphorylchlorid.<sup>[258]</sup> Die Aminolyse dieses Anhydrids durch das Thiazolylamin **96** führte zu der gewünschten Verbindung. Die Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel katalysiert den nukleophilen Angriff. Zudem wirkt Pyridin als schwache Base, welche die *N*-Boc säurelabile Funktionalität gegenüber einer Säurespaltung schützt. Die Schutzgruppe des *N*-acylierten Thiazolylamins **95** wurde über Standardmethoden (TFA) entfernt und führte quantitativ zum TFA-Salz **94**. Die Acylierung der entschützten Aminosäure **94** durch 3,5-Difluorphenylelessigsäure (**93**) mittels des Kupplungsreagenzes EDAC/HOBt führte mit einer Ausbeute von 74% zu der Verbindung **92**. Die Nitrofunktionalität wurde schließlich quantitativ mit Zinnchlorid in heißem Ethanol zum Amin **32** reduziert. Die Gesamtausbeute der Fünfstufensynthese lag bei 43%.

Abb. 35: Synthese der Zielstruktur **32**

Die Verbindung **109** (Abb. 36) wurde nach gleichem Synthesepan hergestellt, wobei anstelle von **97** 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon eingesetzt wurde. Die erzielte Ausbeute bei der Umsetzung mit 3,5-Difluorphenyllessigsäure (**93**) im letzten Schritt lag bei 48%; die Gesamtausbeute der Vierstufensynthese betrug 27%.

Abb. 36: Thiazolyamid **109**Tabelle 3: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Thiazolyamid **32** und **109**

Verbindung	Ausbeute (%)	HPLC Reinheit (%) <sup>c</sup>	clogP <sup>d</sup>	tPSA <sup>d</sup>
<b>32</b>	43 <sup>a</sup>	94	2.81	96.58
<b>109</b>	27 <sup>b</sup>	95	4.24	73.84

<sup>a</sup> Ausbeute über fünf Stufen.

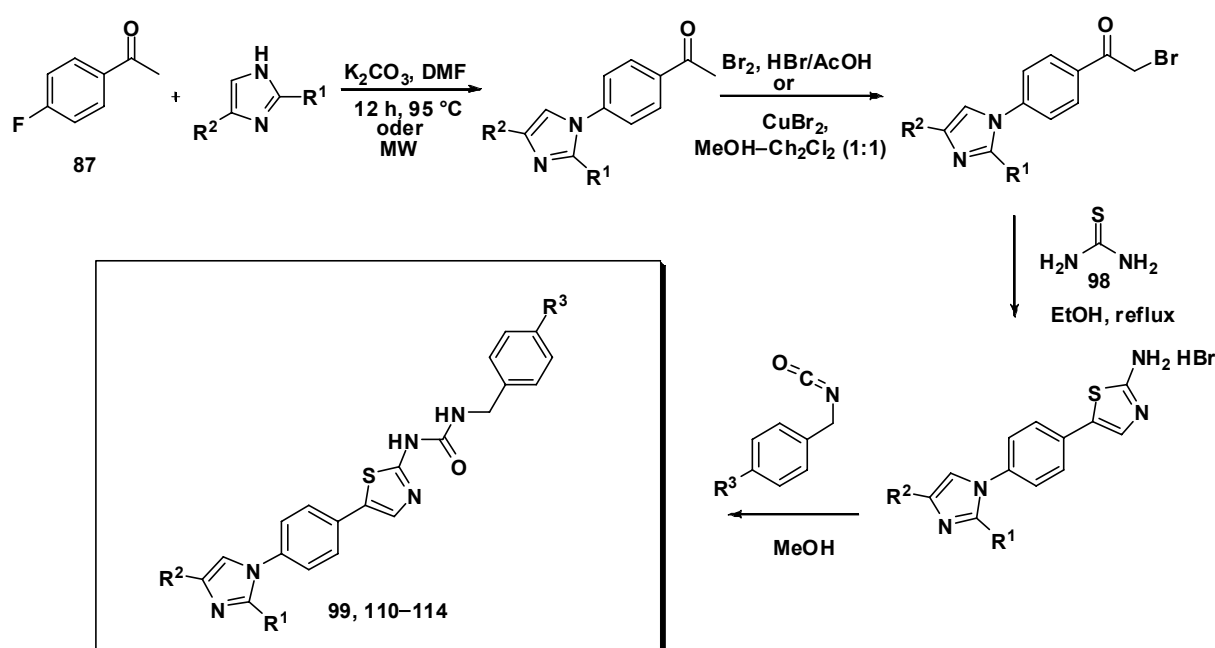
<sup>b</sup> Ausbeute über vier Stufen.

<sup>c</sup> HPLC-Methoden s. Experimenteller Teil.

<sup>d</sup> clogP- und tPSA-Werte berechnet mit Chemdraw.

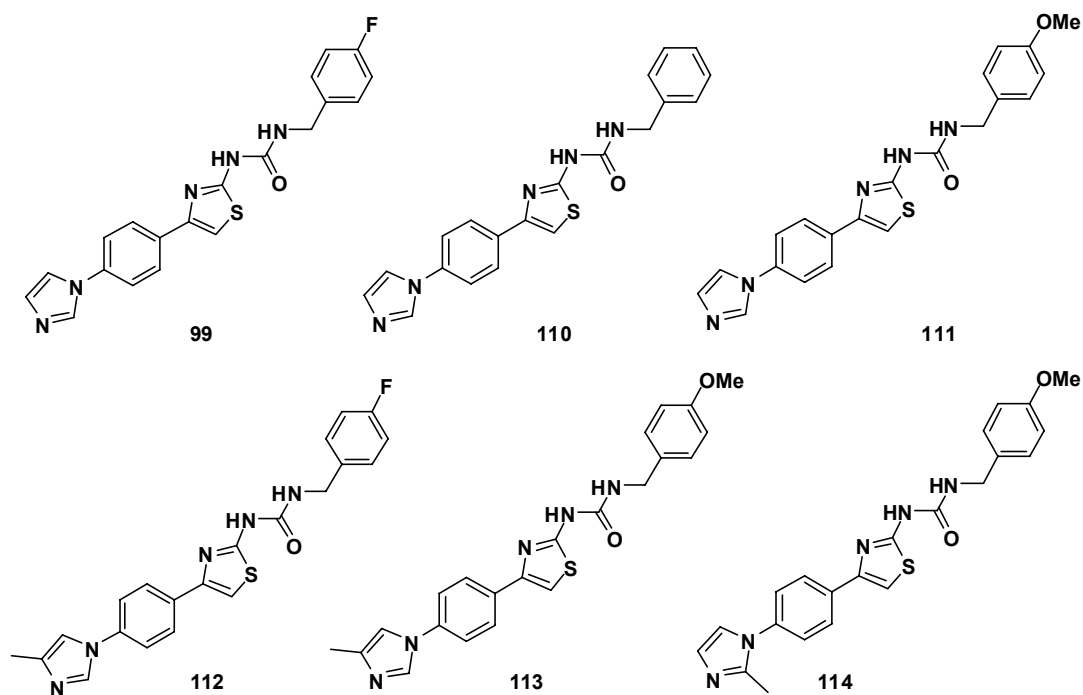
Die Thiazolylharnstoffe **99** sowie **110–114** wurden ebenfalls in einer Vierstufensynthese hergestellt. Die Synthesesequenz der Zielstrukturen ist in Abbildung 37 gezeigt. Wie bei der

Synthese von Verbindung **30** erfolgt der Aufbau des Thiazolrings über eine Hantzsche Cyclokondensation mit einem imidazolsubstituierten Bromacetophenon und Thioharnstoff (**98**) in heißem Ethanol. Das Harnstoffmotif lässt sich mittels einer Kondensationsreaktion eines Isocyanats mit dem Thiazolylamin aufbauen. Das erhaltene Rohprodukt wird mit wässriger HCl gewaschen, um überschüssiges Startmaterial zu entfernen. Die Thiazolylharnstoffe **99** und **110–114** konnten schließlich nach säulenchromatographischer Aufarbeitung in moderaten Ausbeuten gewonnen werden (s. Abb. 38).



**Abb. 37:** Synthese der Zielstrukturen **99**, **110–114**

Tabelle 4 fasst die Ausbeuten, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Thiazolylamine **99** und **110–114** zusammen. Die berechneten clogP-Werte liegen bei allen Verbindungen etwas unter dem Wert 5, was darauf hindeutet, dass die Wirkstoffe günstigere physikochemische Eigenschaften aufweisen als die Torrey Pines Serie. Die tPSA-Werte liegen etwas höher als die der Serie **104–108**, befinden sich aber in einem für das Erreichen des Zentralnervensystems geeigneten Bereich.

Abb. 38: Strukturen der Thiazolylharnstoffe **99** und **110–114**Tabelle 4: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Thiazolylharnstoffe **110–114**

Verbindung	BSc Nummer	Ausbeute <sup>a</sup>	HPLC Reinheit <sup>b</sup>	clogP <sup>c</sup>	tPSA <sup>c</sup>
<b>99</b>	3866	46	95	4.45	69.09
<b>110</b>	3865	57	93	4.30	69.09
<b>111</b>	3871	44	95	4.22	78.32
<b>112</b>	3864	49	92	4.94	69.09
<b>113</b>	3862	67	95	4.72	78.32
<b>114</b>	3863	51	97	4.72	78.32

<sup>a</sup> Ausbeute der letzten Stufe<sup>b</sup> HPLC-Methoden s. Experimenteller Teil.<sup>c</sup> clogP- und tPSA-Werte berechnet mit Chemdraw.

### 3.2.4 Biologische Aktivität

Um die Wirkung auf die  $\gamma$ -Sekretase festzustellen, wurden die Substanzen **30**, **32** und **104–109** bei Hoffmann La Roche einer A $\beta$ -LPECL-Untersuchung (*A $\beta$  liquid phase electrochemiluminescence*) unterzogen. Mittels dieses Assays wurde der Anteil der Isoformen A $\beta$ <sub>38</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> bestimmt. Weiterhin konnten für A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> die IC<sub>50</sub>-Werte bzw. im Fall von A $\beta$ <sub>38</sub> der EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden. Dazu wurde eine aus stabilen, transfizierten menschlichen Neuroglioma-H4-Zellen erhaltene APP-überexprimierende Zelllinie verwendet. Für die C-terminale Sequenz der A $\beta$ -Proteine wurden für A $\beta$ <sub>38, 40, 42</sub> die drei spezifischen Antikörper BAP15 (A $\beta$ <sub>42</sub>), BAP24 (A $\beta$ <sub>40</sub>), und BAP29 (A $\beta$ <sub>38</sub>) verwendet. Diese Antikörper sind mit TAG-Estern, die zur Elektrochemilumineszenz fähig sind und unterschiedliche Aktivitätsbereiche aufweisen, versehen. Für die N-terminale Sequenz wurde ein mit Biotin versehener A $\beta$ -Antikörper (6E10-bio) verwendet. Die in DMSO gelösten Substanzen wurden mit einem Zellkulturmedium zur gewünschten Konzentration verdünnt. 100  $\mu$ L der Substanzlösung wurden zu den Zellen gegeben, die 20 bis 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. 50  $\mu$ L des aufbereiteten Zellkulturmediums wurden mit 50  $\mu$ L auf pH 7 gepufferten, paramagnetischen M-280 Eisenkügelchen und mit je 25  $\mu$ L Antikörper-Lösung versetzt. Die Lösung wird auf 250  $\mu$ L aufgefüllt und drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Synthetische A $\beta$ <sub>38,40,42</sub>-Peptide wurden zur Kontrolle und für die Erstellung von Standardkurven verwendet. Die A $\beta$ -Peptide wurden in DMSO auf 1 mg/ml gelöst und mit Zellkulturmedium auf 16-2000 pg/mL verdünnt. Die Elektrochemilumineszenz wurde mit einem M8-Messgerät der Firma Bioveris gemessen und in die jeweiligen %-Anteile der A $\beta$ -Proteine in Bezug auf die Kontrolle umgerechnet. Nachdem der Überstand für die A $\beta$ -Untersuchung herausgenommen wurde, wurde die Überlebensrate in den entsprechenden Zellen gemessen. Daraufhin werden 80  $\mu$ L der frischen Zellkultur zu jeder Probe gegeben und inkubiert. Anschließend werden 20  $\mu$ L einer MTS/PES-Lösung hinzugegeben, und nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Die Zelltoxizität wird als %-Anteil einer unbehandelten Kontrolle angegeben.

Vergleicht man die Aktivitäten der Thiazole **30**, **32** und **104–109** (s. Abb. 39 und Tabelle 5), so lässt sich daraus relativ schwer ein klarer Trend für eine Struktur-Aktivitätsbeziehung ableiten. Nur das pyrrolidyl-substituierte Thiazolylamin **107** (BSc3009) weist mit EC<sub>50</sub>- und IC<sub>50</sub>-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich eine sehr potente Hemmwirkung auf. Alle



weiteren Substanzen der Serie weisen bei den gemessenen Konzentrationen keine signifikanten Aktivitäten auf. Die Verbindung **30** (BSc3007) scheint einen schwachen Effekt aufzuweisen, der auf eine Modulation hindeutet. Die azidsubstituierten Thiazolylamine **105** und **106** zeigen keine Hemmwirkung und sind daher für weitere Bindungsstudien nicht geeignet. Im Gegensatz dazu sind die Substanzen **32** (BSc3632) und **109** (BSc3729) eindeutig inhibitorisch aktiv. Die erreichte Hemmwirkung der Substanz **32** ist vergleichbar mit den Literaturwerten.<sup>[182]</sup> Die neue Verbindung **109** zeigt zwar etwas schwächere, aber immer noch sehr potente Hemmwerte.

**Tabelle 5:** Biologische Aktivität der Thiazolylamide und -amine

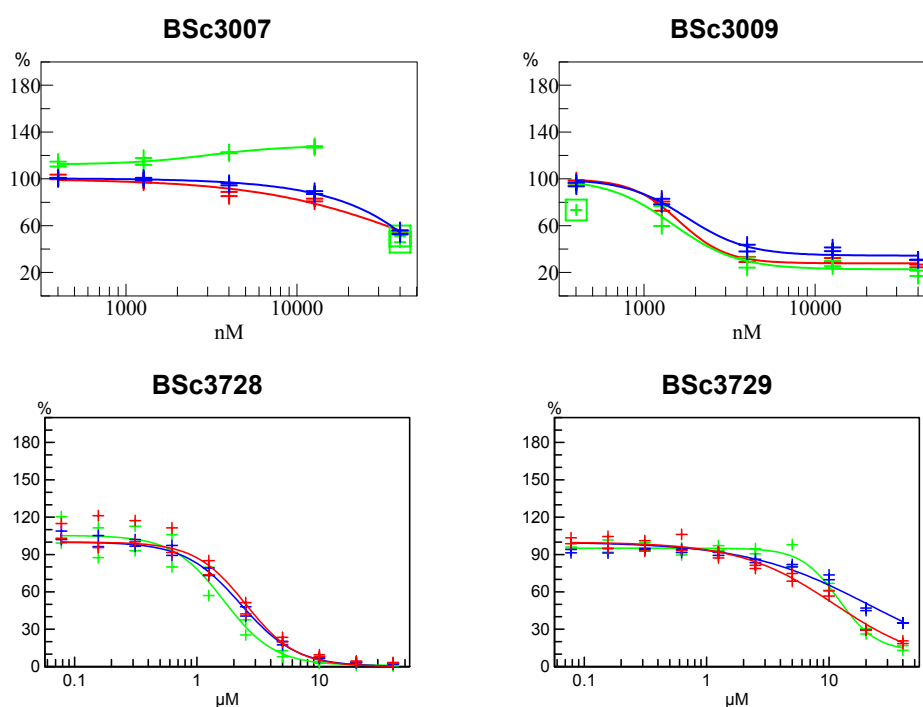
	Verbindung	BSc Nummer	Zelltoxizität <sup>a</sup> ( $\mu\text{M}$ )	EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>		
				A $\beta$ <sub>38</sub>	A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$
1	<b>106</b>	BSc3004	n.b. <sup>c</sup>	n.a. <sup>d</sup>	n.a	n.a
2	<b>105</b>	BSc3005	n.b.	n.a	n.a	n.a
3	<b>30</b>	BSc3007	n.b.	n.a	n.a	>40
4	<b>104</b>	BSc3008	n.b.	n.a	n.a	n.a
5	<b>107</b>	BSc3009	>80	3.1	3.4	3.2
6	<b>32</b>	BSc3728	>80	1.7	2.3	2.5
7	<b>109</b>	BSc3729	>80	12.0	20.8	11.1

<sup>a</sup> Konzentration, bei der eine signifikante Zelltoxizität auftritt. Überlebensrate >20%.

<sup>b</sup> Für A $\beta$ <sub>38</sub> sind die EC<sub>50</sub> angegeben.

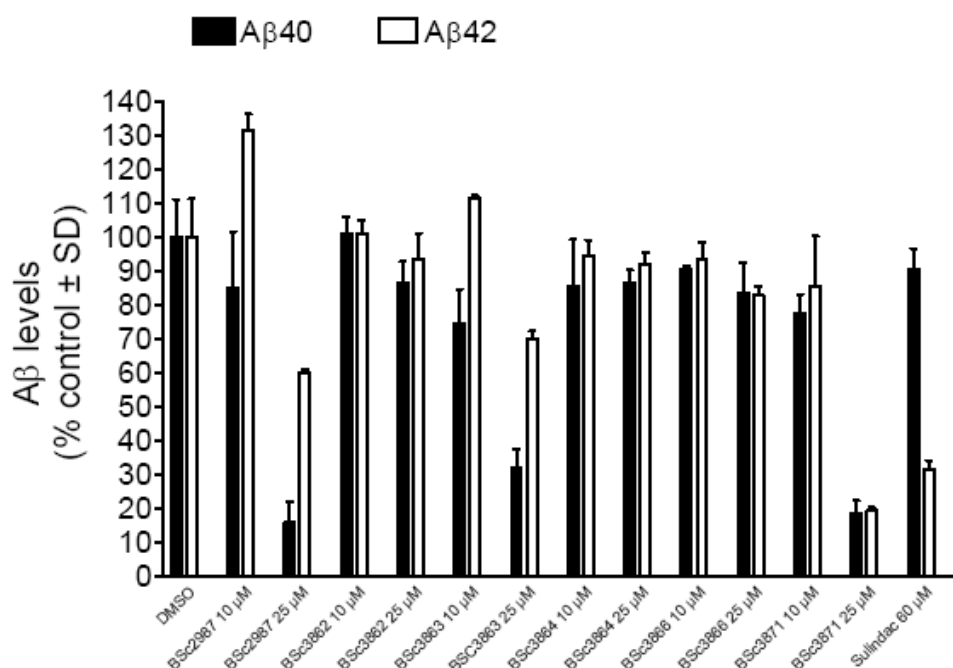
<sup>c</sup> n.b. = nicht bestimmt.

<sup>d</sup> n.a. = nicht aktiv



**Abb. 39:** Dosis-abhängige Wirkung ausgewählter Thiazolylamide und -amine; Grün A $\beta$ <sub>38</sub>, blau: A $\beta$ <sub>40</sub>; rot: A $\beta$ <sub>42</sub>.

Den Einfluss auf die A $\beta$ -Aktivität der Verbindungen **99** und **110–115** wurde anhand eines Zellassays von Sascha Weggen, Universität Düsseldorf, untersucht. Dabei wurden 7WML-CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) verwendet, die APP751 und PS1-M146L stabil überexprimieren.<sup>[19]</sup> Als Nachweis für die A $\beta$ -Aktivität wurde ein immunologisches Nachweisverfahren, ein ELISA-Assay (*enzyme linked immunosorbent assay*), durchgeführt. In Abb. **40** ist die graphische Auswertung dieser Untersuchung zu sehen. Die Gesamtmenge von A $\beta$  wurde bei zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M) mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Als Referenzsubstanz diente der Modulator Sulindac, der den A $\beta_{42}$ -Spiegel selektiv hemmt, sowie die Verbindung BSc2987, die den A $\beta_{40}$ -Spiegel selektiv hemmt.<sup>[259]</sup> Die Verbindung **114** (BSc3863) und **111** (BSc3871) zeigen bei der Konzentration von 25  $\mu$ M eine signifikante Reduktion der A $\beta$ -Konzentrationen. Beide Substanzen wirken bei dieser Konzentration inhibitorisch und nicht modulatorisch; führen somit zu einer Reduktion der A $\beta_{40}$ - und A $\beta_{42}$ -Konzentrationen. Die Verbindung **111** (BSc3871) unterschreitet dabei sogar den Hemmwert von Sulindac bei einer niedrigeren Konzentration (25  $\mu$ M versus 60  $\mu$ M). Bei der Verbindung **114** (BSc3863) wurde allerdings ein verlangsamtes Zellwachstum beobachtet. Daher deutet die Aktivität eher auf einen Toxizitätseffekt hin. Bei allen anderen Substanzen konnte keine Veränderung im Zellwachstum beobachtet werden.



**Abb. 40:** Graphische Auswertung der A $\beta$ -Hemmung der Verbindungen **110–114** in einem zellulären Assay von CHO-Zellen, die APP751 und PS1-M146L überexprimieren. Die Gesamtmenge an A $\beta$  wird bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen (10  $\mu$ M und 25  $\mu$ M) prozentual mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. Als Referenzsubstanzen dient Sulindac (Konzentration: 60  $\mu$ M).

### 3.2.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mittels der in dieser Arbeit entwickelten Synthesen konnten verschiedene Thiazolylamine und -amide erfolgreich hergestellt werden. Zudem wurde eine Syntheseroute für neue Thiazolylharnstoffe etabliert. Wie vermutet waren einige dieser semi- und nicht-peptidischen Verbindungen, darunter die neuen Strukturen **107** und **109**, in der Lage, die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase im unteren mikromolaren Bereich zu hemmen. Weiterhin wurde der Einfluss der Verbindungen **99** und **110–114** auf die A $\beta$ -Konzentrationen im zellulären Assay gezeigt. Allerdings ist noch nicht bekannt, welche grundlegenden Prozesse eine Rolle spielen und welchem Wirkmechanismus die Substanzen folgen. Die ungewöhnlich hohe Lipophilie (clogP = 6.8) lässt darauf schließen, dass die Verbindung **30** und deren Analoga potente Liganden mit hoher Bindungsaffinität an Proteinaggreagate wie Tau- und A $\beta$ -Fibrillen sind. Daher wurden die Eigenschaften dieser Verbindungen auf die Peptid- und Proteinaggregation untersucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.4 dargestellt.

Zwei Substanzen der Pfizer AG mit Arylthiazol-Funktionalität haben sich im Verlauf klinischer als leberschädigend erwiesen und wurden aus weiterführenden Untersuchungen zurückgezogen. Die mäßigen pharmakologischen Eigenschaften sowie das metabolisch instabile und hepatotoxische Arylthiazol-Fragment werden daher den Substanzen aus der Torrey Pines Serie bei einer weiteren klinischen Entwicklung im Weg stehen.

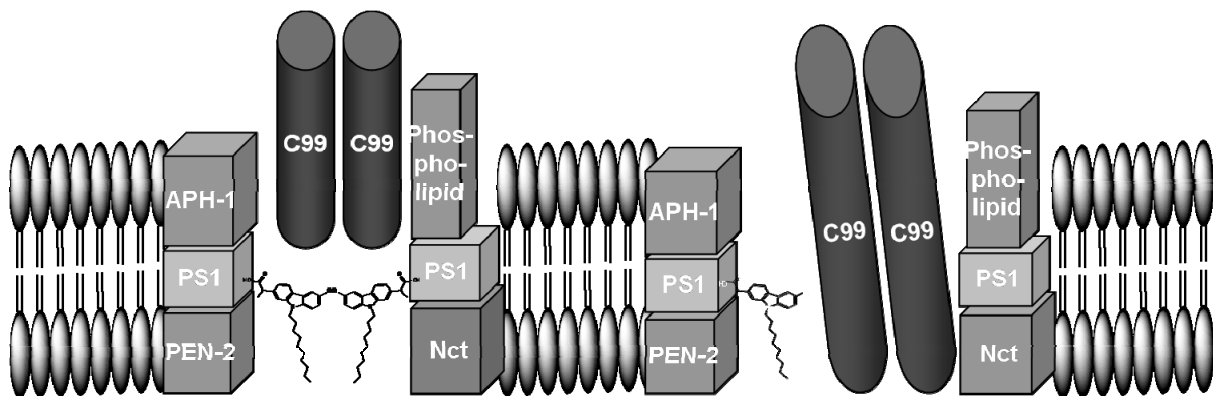
Im Folgenden werden zwei Modelle diskutiert, die die modulierenden bzw. inhibitorischen Eigenschaften der Substanzen erklären.

### 3.3 Modelle der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition und Modulation

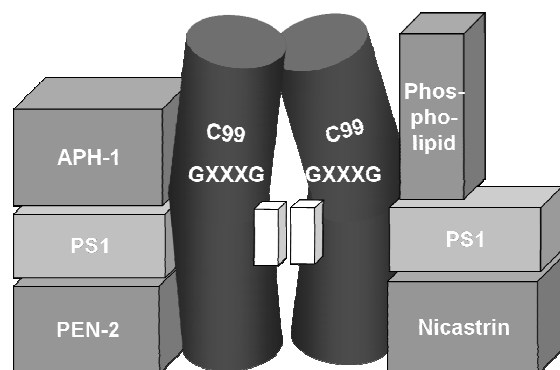
Bisher gibt es noch keine zufrieden stellende Erkenntnis über die strukturelle Beschaffenheit der Bindungsstelle der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren. Es werden daher verschiedene Modelle diskutiert, die zum einen die inhibitorischen Eigenschaften und zum anderen die modulierenden Eigenschaften diverser Substanzen erklären könnten (s. Abb. 41)., Auf das aktive Zentrum gerichtete potente Inhibitoren zeigen modulierende Eigenschaften bei Konzentrationen unterhalb ihres IC<sub>50</sub>-Wertes. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass es mindestens zwei Bindungsstellen des aktiven Komplexes geben müsste, wovon eine für die Substraterkennung, die andere für die Substratspaltung<sup>[260]</sup> verantwortlich sein könnte. Diese Beobachtung stimmt mit der Aktivität von PS1-Asp-Mutanten, die von Christian Haass und Harald Steiner entwickelt wurden, überein.<sup>[261]</sup> Man geht davon aus, dass die Besetzung der

einen Bindungsstelle ein Abknicken des dimeren Substrats verursacht und bewirkt, dass dieses schließlich an der A $\beta$ <sub>42</sub>-Schnittstelle geschnitten wird. Im Gegensatz dazu ist die Besetzung von beiden Seiten ein Resultat der Vollinhibition des Enzyms (Abb. 41a). Daher ist die Abstandsmessung der beiden Bindungsstellen ein wichtiges Ziel von weiteren Studien. Ein anderes Modell (Abb. 41b) geht davon aus, dass GSMs wie NSAIDs nicht direkt an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex binden, sondern vielmehr mit dem Substrat APP interagieren und dadurch das Schnittmuster des Enzyms verändern. Die Dimerisierung von APP könnte durch die Anbindung der Substanzen an das Substrat beeinflusst werden. Welche Mechanismen tatsächlich vorliegen, konnte noch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass das mit einer photoaktivierbaren Gruppe versehene Flurbiprofen an das Substrat und nicht an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex bindet.<sup>[204]</sup>

a)



b)



**Abb. 41:** a) Vereinfachtes Modell der  $\gamma$ -Sekretase-Modulation durch die Besetzung von einer oder zwei Bindungsstellen des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes. Niedrige Inhibitiorkonzentrationen führen zu der Besetzung von nur einer Bindungsstelle, was in einem Abknicken des dimeren C99-Substrates resultiert und so das veränderte Schnittmuster bewirkt.

b) Substratanbindung der GSMs führt zur Modulation.

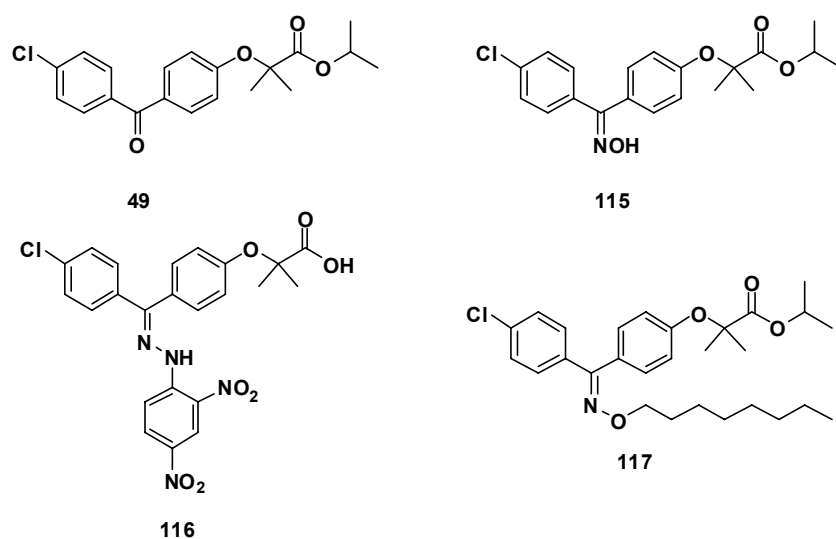
Die hier diskutierten Modelle dienen als Grundlage für die Entwicklung von Fenofibrat-abgeleiteten  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

### 3.4 Fenofibrat-abgeleitete $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren

Fenofibrat (**49**, Abb. 42) ist ein PPAR $\alpha$ -Agonist<sup>[262]</sup> und wird als Medikament zur Regulation des Fettstoffwechsels eingesetzt. In H4-Zellen bewirkt Fenofibrat einen dosisabhängigen Anstieg der A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegel um über 300% und eine Absenkung der A $\beta$ <sub>38</sub>-Spiegel um bis zu 60%. Die A $\beta$ <sub>40</sub>-Konzentration bleibt dabei unbeeinflusst,<sup>[263]</sup> **49** wirkt demnach als „inverser“ Modulator. Fenofibrat weist in den Laktose-Dehydrogenase- sowie im 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay bei den untersuchten Konzentrationen keine Toxizität auf. Bemerkenswert ist zudem, dass der Metabolit (Fenofibrat-Säure) den A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegel bis zu einer Konzentration von 250  $\mu$ M nicht beeinflusst. Obwohl Fenofibrat auch den A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegel *in vitro* erhöht, fehlt der Beweis für eine Erhöhung von A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegeln bei Mäusen. Die schnelle Hydrolyse von Fenofibrat zur Säure sowie die fehlende Hirngängigkeit lässt darauf schließen, dass es nicht in der Lage ist, den A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegel beim Menschen zu erhöhen.<sup>[264, 265]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Fenofibrat und abgeleitete Derivate als potentielle „normale“  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren bzw. Vorstufen potentieller  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren Einfluss auf die A $\beta$ -Konzentrationen nehmen und zu Bindungsstudien herangezogen werden können. In Arbeiten von B. Schmidt und Mitarbeitern wurde bereits gezeigt, dass von Carprofen und Curcumin abgeleitete Verbindungen als potente  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren wirken.<sup>[189, 266, 267]</sup> So wurden GSMs entwickelt, die als Grundgerüst das NSAID Carprofen aufweisen und mit zwei für die Modulation essentiellen Funktionalitäten ausgestattet sind: einer Carbonsäure, die wahrscheinlich mit dem Substrat interagiert und einem lipophilen Rest, welcher für die Orientierung des Modulators in der Membran verantwortlich zu sein scheint. Des Weiteren gelang der Aktivitäts-Transfer auf Carbazolderivate,<sup>[189]</sup> die im Gegensatz zu Carprofen kein stereogenes Zentrum ( $IC_{50}(A\beta_{42}) = 11 \mu M$ ) aufweisen. Die Substanzen sind nahezu equipotent und momentane Untersuchungen fokussieren eine Aktivitätssteigerung. Durch die Einführung lipophiler Resten und die Freilegung der Säurefunktionalität könnte auch Fenofibrat in der Lage sein, die  $\gamma$ -Sekretase modulierend zu beeinflussen. Durch die Umwandlung des Ketons in ein Oxim lassen sich durch eine O-Alkylierung lipophile Reste einführen. Bei Carprofen- und Carbazolderivaten zeigte sich, dass insbesondere C-8 Ketten zu einer hohen Aktivität führen. Daher werden bei Fenofibrat verschieden lange Alkylketten eingeführt (z.B. **117**, Abb. 42). Dazu wird die Ketofunktion zum Oxim **115** (Abb. 42) umgewandelt, welches schließlich mit langkettigen Halogenalkanen umgesetzt werden kann. Nach Freilegung der

Säurefunktionalität werden die  $\gamma$ -Sekretase-modulierenden Eigenschaften der Verbindungen untersucht.

Gäbe es tatsächlich zwei (oder mehrere) Bindungsstellen, stellt sich die Frage nach deren Lokalisierung. Ein potentes Dimer, dessen beide Einheiten mit einem variablen Abstandhalter verbunden sind, könnte mit beiden Bindungsstellen interagieren. Durch die Länge dieses Abstandshalters könnte man Informationen über die Entfernung und Aminosäuresequenz der beiden Bindungsstellen gewinnen. Die Synthese von Fenofibratdimeren mit variablen Alkylketten könnte daher zu einer Lokalisierung und Abstandsmessung der Bindungsstellen dienen. Die Umsetzung von Fenofibrat mit Hydrazinderivaten liefert Hydrazone (z.B. **116**, Abb. 42), die im Hinblick auf ihre färbenden und UV-aktiven Eigenschaften zur Aufklärung des Mechanismus der  $\gamma$ -Sekretase-Modulation für Bindungsstudien herangezogen werden könnten. Im Folgenden werden zunächst die Synthesen der Verbindungen beschrieben und schließlich die Ergebnisse der biologischen Untersuchung vorgestellt.

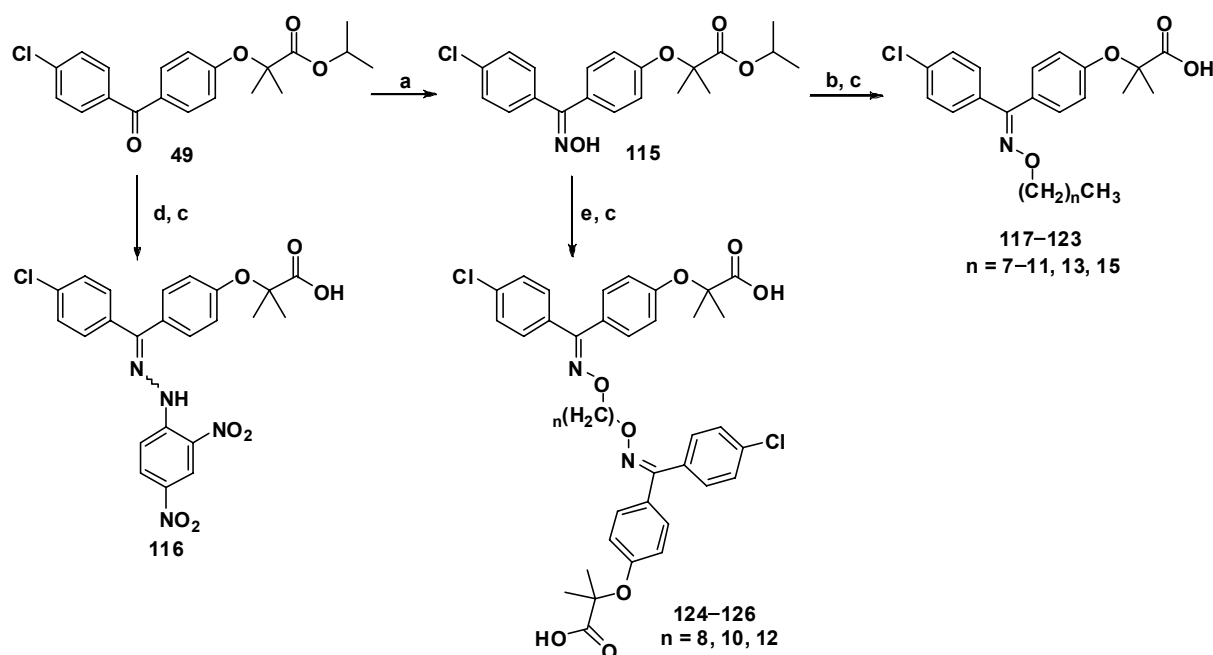


**Abb. 42:** Fenofibrat (**49**), Fenofibrat-Oxim (**115**) und Syntheseprodukte (**116**, **117**).

### 3.4.1 Synthese von Fenofibrat-abgeleiteten $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren

Die Fenofibrat-abgeleiteten, potentiellen GSMs wurden nach folgendem Synthesepplan hergestellt. (Abb. 43). Zunächst wurde Fenofibrat (**49**) mit Hydroxylamin-Hydrochlorid zum Oxim **115** umgesetzt. Dabei wird der Stickstoff des Hydroxylamin-Hydrochlorids nukleophil an die Ketofunktion des Fenofibrats addiert, wobei die Protonen des Hydrochlorids durch Protonierung der Ketofunktion als Katalysator der Reaktion wirken. Das entstehende

Halbaminal reagiert durch Kondensation im basischen Milieu des Lösungsmittels Pyridin zum Oxim. Bei der funktionellen Gruppe des Oxims ist zu beachten, dass sowohl der Stickstoff als auch der Sauerstoff nukleophil reagieren können. Die Reaktivität solcher ambivalenten Moleküle lässt sich mit Hilfe von elektronenziehenden oder -schiebenden Substituenten regulieren. Eine Alkylierung am Sauerstoff findet bei Verwendung Ersterer statt. Um eine Deprotonierung am Sauerstoff zu erreichen, jedoch gleichzeitig die nukleophile Substitution zu verhindern, wird Natriumhydrid zur Synthese der Verbindungen **117–123** (s. Abb. 43) eingesetzt. Dabei entsteht das Natrium-Oximsalz, welches in Lösung stabil ist. Im weiteren Schritt reagiert das Oxim-Anion mit dem Halogenalkyl nach einer S<sub>N</sub>2-Reaktion. Im letzten Schritt wird der Isopropylester verseift und so die Säurefunktionalität freigelegt. Da Alkyloxime empfindlich gegenüber Säuren sind, wird die Esterspaltung im basischen Milieu durchgeführt.



**Abb. 43:** Synthese der Fenofibrat-abgeleiteten Derivative **116–126**.

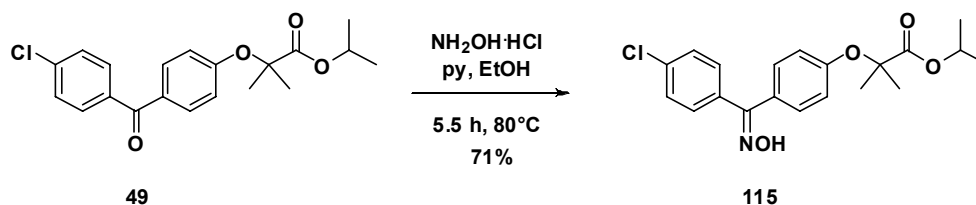
(a) NH<sub>2</sub>OH·HCl, Pyridin, EtOH, 80 °C, 4 h; (b) NaH, RX, DMF, 0 °C bis r.t., 6–12 h; (c) 2 N NaOH, MeOH, r.t., 4–12 h; (d) (2,4-Dinitrophenyl)hydrazin, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MeOH, r.t., 2 h; (e) NaH, X–R–X (0.5 equiv), DMF, 0 °C bis r.t., 6–12 h.

Die Fenofibratdimere **124–126** mit variabler C-Kettenlänge werden analog hergestellt. Allerdings werden 0.5 equiv von Dihalogenalkylketten eingesetzt. Zur Synthese des Hydrazons **116** (Abb. 43) wird Fenofibrat **49** direkt mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. Die Ketofunktion des Fenofibrats wird dabei durch Zugabe einer katalytischen Menge an Säure protoniert. Dies verursacht eine erhöhte Elektrophilie der Carbonylfunktion des

Fenofibrats und erleichtert den nukleophile Angriff des Hydrazin-Stickstoffatoms. Das entstehende Halbaminal reagiert unter Kondensation zum Fenofibratisopropylester-2,4-dinitrophenylhydrazon, das im zweiten Schritt zur Säure **116** verseift wird.

### 3.4.2 Ergebnisse

Das Oxim **115** wurde mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in Ethanol–Pyridin synthetisiert (s. Abb. 44). Durch eine schrittweise Erhöhung der Stoffmenge des Hydroxylamins auf 2.5 equiv ließ sich die Ausbeute auf 71% erhöhen. Das Oxim wurde als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten (HPLC-Reinheit: 97%).



**Abb. 44:** Syntheschema zur Darstellung des Oxims **115**

Die *O*-Alkylierung des Oxims wurden mit NaH und Halogenalkanen in DMF bei tiefen Temperaturen durchgeführt (s. Abb. 44).<sup>[268]</sup> Die Aufarbeitung der Ester erfolgte mittels Säulenchromatographie (Laufmittel Cy–DCM 4:5). Die Ester wurden als farblose Öle erhalten, die durch Lagerung bei Temperaturen unter 0 °C fest wurden. Die Ausbeuten variierten zwischen 50% und 79%, die Reinheiten zwischen 83% und 87% (s. Tabelle 6). Die Dimere wurden ebenfalls ausgehend von Oxim **115**, NaH und 0.5 equiv Dihalogenalkanen in moderaten bis guten Ausbeuten hergestellt. Da die Esterspaltung im basischen Milieu keine Gleichgewichtsreaktion ist, war ein quantitativer Umsatz zu den jeweiligen Säuren zu erwarten (vgl. 2.3). Die Verseifung der einzelnen Ester zu den Säuren **117–126** erfolgte mit 2 N NaOH in Methanol. Die quantitative Produktbildung ist über die Löslichkeit des Produktes zu erkennen. Um zu verhindern, dass die Alkyl-Oxime gespalten werden, sollte bei saurer Aufarbeitung ein pH-Wert von 4 nicht unterschritten werden. Als Produkte wurden farblose Öle erhalten, die wiederum durch die Lagerung bei Temperaturen unter 0 °C fest wurden. Die Ausbeuten der Verseifung lag im Bereich von 83–97%.

Das Hydrazon **116** wurde ausgehend von Fenofibrat (**49**) und 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Methanol und einer katalytischen Menge an konz. Schwefelsäure in 70% Ausbeute hergestellt



(s. Abb. 42, Tabelle 6). Im zweiten Schritt wurde der Isopropylester ebenfalls mit wässriger NaOH-Lösung zur Säure verseift.

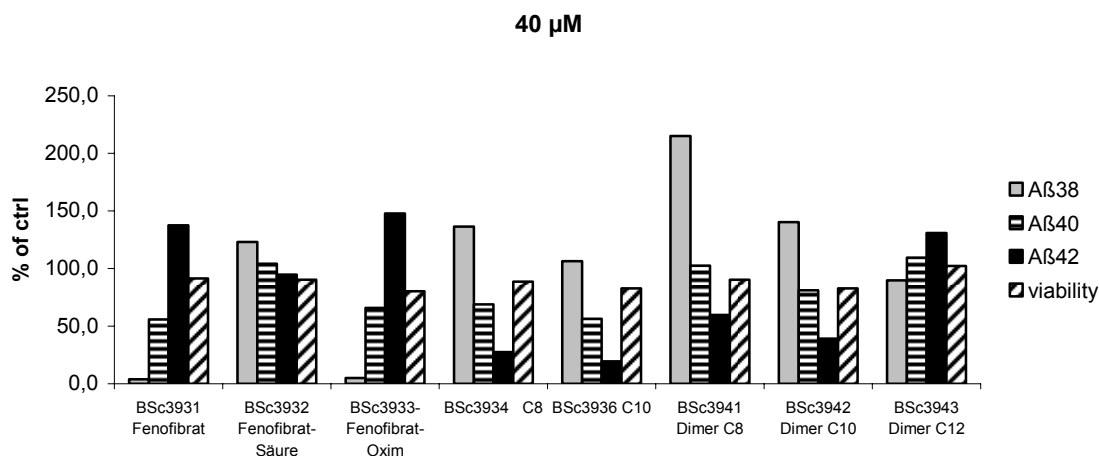
**Tabelle 6:** Ausbeute und HPLC-Reinheit der hergestellten Fenofibratderivate

R	Ester			Säuren			
	Ausbeute (%)	HPLC Reinheit (%) <sup>a</sup>	BSc Nr.	Verbindung	Ausbeute (%)	HPLC Reinheit (%) <sup>a</sup>	BSc Nr.
2,4-dinitro-phenyl-hydrazon	70	90	3988	<b>116</b>	75	85	3989
octyl	52	89	3974	<b>117</b>	98	97	3934
nonyl	50	87	3975	<b>118</b>	97	94	3935
decyl	68	84	3976	<b>119</b>	78	95	3936
undecyl	70	99	3977	<b>120</b>	75	83	3937
dodecyl	79	90	3978	<b>121</b>	66	94	3938
tetradecyl	56	98	3979	<b>122</b>	75	90	3939
hexadecyl	73	80	3980	<b>123</b>	78	89	3940
octyl	62	92	3981	<b>124</b>	92	96	3941
nonyl	52	88	3982	<b>125</b>	88	93	3942
decyl	49	75	3983	<b>126</b>	88	96	3943

<sup>a</sup> HPLC-Reinheit (Methoden s. Experimenteller Teil).

<sup>b</sup> clogP- und tPSA-Werte, berechnet mit Chemdraw.

Die Verbindungen **116–126** wurden im LPCL-Assay untersucht. Auch die Zellüberlebensrate wurde in einem Zellproliferationsassay bestimmt (CellTiter 96™ AQ Assay, Promega). Von einigen ausgewählten Verbindungen wurden zunächst die Aktivitäten bei einer Konzentration von 40 µM gemessen (s. Abb. 45). Dabei zeigte sich, dass Fenofibrat (BSc3931) wie erwartet als inverser Modulator wirkt. Die Säure (BSc3932) zeigte keine Aktivität, das Oxim **115** (BSc3933) wirkte ebenfalls invers modulierend. Die Verbindungen **117** (BSc3934) und **119** (BSc3936) zeigten eine signifikante modulierende Wirkung. Bei einer Konzentration von 40 µM wurde die Konzentration von Aβ<sub>42</sub> um bis zu 60% gehemmt, die Konzentration von Aβ<sub>38</sub> war stark erhöht. Die Effekte der Dimere **124** (BSc3941) und **125** (BSc3942) sind schwächer, allerdings zeigte sich auch hier die modulierende Eigenschaft der Verbindungen. Das C-10 Dimer BSc3941 bewirkt den stärksten Anstieg von Aβ<sub>38</sub>. Das C-12 Dimer **126** (BSc3943) zeigte keinen Effekt. Die invers modulierende Wirkung von Fenofibrat war bei allen alkylierten Verbindungen eindeutig umgekehrt, allerdings ist die Konzentration, bei der dieser Effekt eintritt, relativ hoch. Die Zellüberlebensrate liegt bei der untersuchten Konzentration (40 µM) über 80%.



**Abb. 45:** Aktivitäten einiger ausgewählter Fenofibratderivate bei einer Konzentration von 40  $\mu$ M.

Die vielversprechenden Ergebnisse veranlassten uns zu einer Bestimmung der Dosis-abhängigen Wirkung und der  $IC_{50}$  Werte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und der Abbildung 46 zusammengefasst. Hierbei zeigte sich, dass vier Substanzen bei niedrigen Konzentrationen messbare Effekte zeigen. Einen moderaten modulierenden Effekt wies **117** (BSc3934) auf, das C-8 Fenofibrat. Die modulierende Tendenz ist zwar auch bei den weiteren O-alkylierten Derivaten zu erkennen, allerdings treten die Effekte erst bei höheren Konzentrationen auf. Das Hydrazon **116** (BSc3989) weist eine Totalhemmung, also einen inhibitorischen Effekt auf. Die Wirkungen der Dimere **124** (BSc3941) und **125** (BSc3942) sind relativ schwach; die Tendenz der Modulation ist allerdings erkennbar.

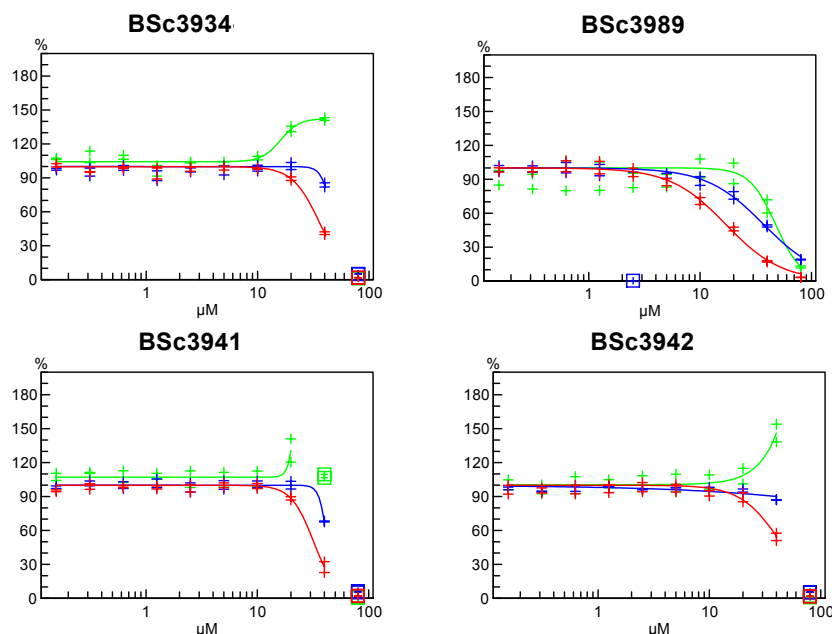
**Tabelle 7:** Biologische Aktivität der O-alkylierten Fenofibratderivate

	Verbindung	BSc Nummer	Zelltoxizität <sup>c</sup> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>		
				A $\beta$ <sub>38</sub>	A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$
1	<b>117</b>	BSc3934	80	16.1	47.6	36.2
2	<b>118</b>	BSc3935	-	>40	>40	>40
3	<b>119</b>	BSc3936	-	>80	>80	36.1
4	<b>120</b>	BSc3937	-	>40	>40	>40
5	<b>121</b>	BSc3938	80	>40	>40	>40
6	<b>122</b>	BSc3939	-	>80	>80	>80
7	<b>123</b>	BSc3940	-	>80	>80	>80
8	<b>116</b>	BSc3989	-	47.6	37.3	23.7
9	<b>124</b>	BSc3941	80	>40	>40	>40
10	<b>125</b>	BSc3942	80	>40	>40	>40
11	<b>126</b>	BSc3943	80	>40	>40	>32.6

<sup>a</sup> Für A $\beta$ <sub>38</sub> sind die EC<sub>50</sub> angegeben.

<sup>b</sup> Die maximale Wirkung auf A $\beta$ <sub>38</sub> wird bei einer Konzentration von 40  $\mu$ M nicht beobachtet.

<sup>c</sup> Konzentration, bei der eine signifikante Zelltoxizität auftritt. Reduktion der Überlebensrate um >20%.



**Abb. 46:** Dosis-abhängige Kurven der aktivsten O-alkylierten Fenofibrat-Oxim- und Hydrazon-Derivate. Grün  $A\beta_{38}$ , blau:  $A\beta_{40}$ ; rot:  $A\beta_{42}$ .

Anzunehmen ist, dass die lipophilen Substituenten die Fenofibratderivate in der notwendigen Orientierung in der Membran verankern. Die maximale Alkylkettenlänge, die toleriert wird sollte die Länge einer natürlichen Phospholipidmembran daher nicht überschreiten. Die Ergebnisse der Fenofibratdimere weisen darauf hin, dass mit der C-12-Alkylkette die maximale Länge erreicht wird. Die Ergebnisse geben allerdings keinen Hinweis darauf, ob die beiden Säurefunktionalitäten des Dimers Wechselwirkungen mit beiden Bindungsstellen aufweisen. Die Synthese weiterer Dimere mit kürzeren Alkylketten (C-4 bis C-7) könnte zeigen, ob sich die Aktivitätssteigerung fortsetzen lässt. Durch die Variation des Linkers, z.B. die Verwendung von Amins substituenten oder starren Systemem könnte ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung führen. Die Synthesen hierfür sind hinreichend bekannt und in dieser Arbeit beschrieben.

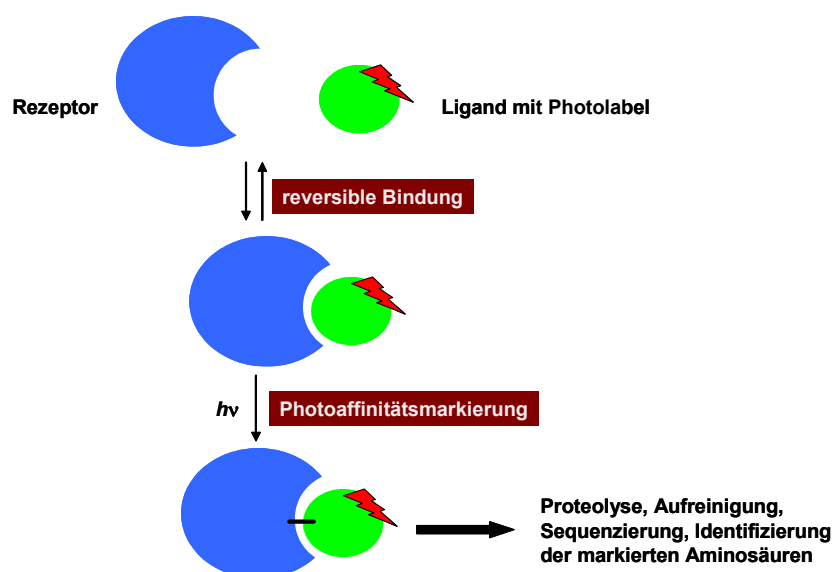
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Eigenschaft der inverseren Modulation von Fenofibrat durch die Einführung lipophiler Reste wie Alkylketten und eines Aromaten zu der gewünschten „normalen“ Modulation hin umgekehrt werden konnte. Die Verbindungen beeinflussen die Spaltung von  $A\beta$ ; sie reduzieren insbesondere die Bildung von  $A\beta_{42}$  und erhöhen die  $A\beta_{38}$ -Konzentrationen. Besonders die Verbindung **117** (BSc3934) zeigt einen modulierenden Effekt, allerdings nur bei hohen Konzentrationen. Auch die Dimere weisen bei relativ hohen Konzentrationen eine Modulation auf. Die notwendigen Konzentrationen für die  $IC_{50}/EC_{50}$ -Bestimmung wurden mit  $40\ \mu M$  allerdings nicht erreicht. Für einige Verbindungen wurde in H4-Zellen bei Konzentration von  $>80\ \mu M$  eine Zelltoxizität beobachtet.

Da Fenobrat als Medikament eingesetzt wird, sind die *in silico* Parameter dieser Verbindung prinzipiell geeignet. Die Einführung des lipophilen Substituenten verursacht jedoch einen enormen Anstieg des clogP-Wertes (vgl. Fenofibrat: tPSA: 52.6, clogP: 5.2; Fenofibrat-C8-Oxim: tPSA: 57.1, clogP: 10.2).

Die gewünschte selektive Reduktion von A $\beta$ <sub>42</sub> sowie der begleitende Anstieg des weniger zur Aggregation neigenden A $\beta$ <sub>38</sub>-Fragments wird von mehreren Verbindungen erzielt (z.B. **117**, **124**). Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass sich die Fenofibrat-Grundstruktur als Leitstruktur für die  $\gamma$ -Sekretase-Modulation eignet, jedoch liegen die Aktivitäten noch nicht im gewünschten nanomolaren Bereich. Es sind weitere Verbesserungen in der Aktivität, der Löslichkeit sowie eine weitere Untersuchung in neuronalen Zellen notwendig, bevor eine *in vivo* Aktivitätsuntersuchung erfolgen kann.

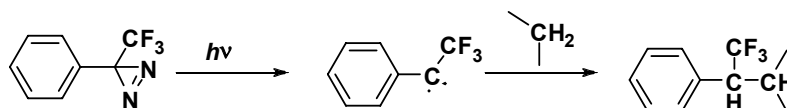
### 3.5 Studien zur Identifizierung der $\gamma$ -Sekretase-Bindungsstelle

Zur Identifizierung von Bindungsstellen eignen sich verschiedene Methoden wie NMR-Bindungsstudien, Molekulares Modelling oder die Kristallstrukturanalyse. Bisher ist es nicht gelungen, die  $\gamma$ -Sekretase zu kristallisieren, daher sind relativ wenige Informationen über die Bindungsstelle vorhanden. Eine weitere Methode zur Identifizierung von Bindungsstellen sind Photoaffinitätsmarkierungsexperimente. Dabei wird ein potenter Ligand mit einer photosensitiven Gruppe versehen, die unter Lichteinstrahlung in eine reaktive Einheit zerfällt und eine kovalente Bindung mit einem umliegenden Atom der Bindungsstelle des Rezeptors eingeht. Die markierten Aminosäuren lassen sich nach anschließender Proteolyse und Aufreinigung durch massenspektroskopische Untersuchungen identifizieren (s. Abb. 47).



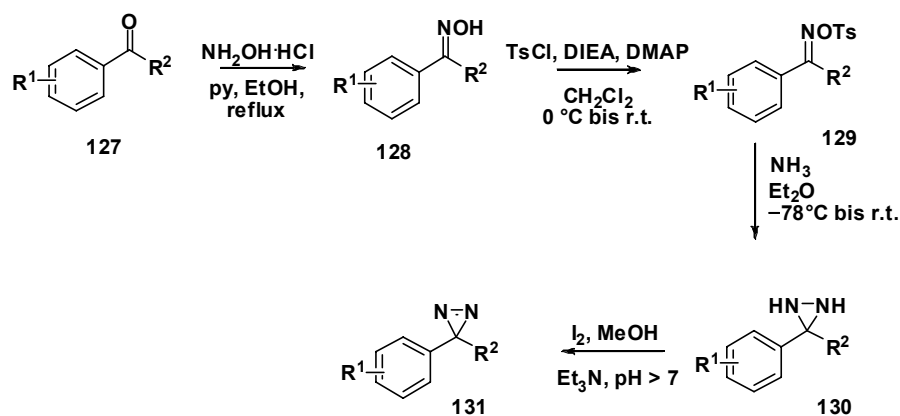
**Abb. 47:** Photoaffinitätsexperimente zur Identifizierung der Aminosäuresequenz der Bindungsstelle.

Für die Identifizierung muss das Photophor eine leicht detektierbare Gruppe wie Biotin oder eine fluoreszente Einheit tragen. Alternativ kann aber auch ein radioaktives Atom verwendet werden. Arylazide, Diazirine und Benzophenone sind die drei gebräuchlichsten photoreaktiven Gruppen, die in Photoaffinitätsexperimenten eingesetzt werden. Arylazide reagieren unter Bestrahlung zu Nitrenen, die unspezifisch in umliegende Bindungen insertieren und eine relativ lange Lebenszeit aufweisen. Diazirin und seine linearen Isomere, die Diazoverbindungen, zerfallen zu den reaktiveren Carbenen. Benzophenon weist zwar eine höhere Stabilität auf, aufgrund seines sterischen Anspruchs ist dieser Baustein allerdings nicht für alle Liganden geeignet. Seit der Entdeckung der Photoaffinitätsmarkierung durch Westheimer im Jahr 1962 wurden zahlreiche Verbesserungen erzielt. Die Entwicklung von 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirinen durch Brunner et al.<sup>[269]</sup> stellt einen Meilenstein in der Entwicklung von photoreaktiven Gruppen dar, da nun neben einer höheren chemischen Stabilität eine UV-Wellenlänge gewählt werden kann, die nicht im Bereich der UV-Absorption von Proteinen liegt. Die Photochemie eines Diazirins ist in Abb. 48 gezeigt. Unter Bestrahlung reagiert es zu einem Carben, das schließlich in C–H- oder N–H-Bindungen insertiert.

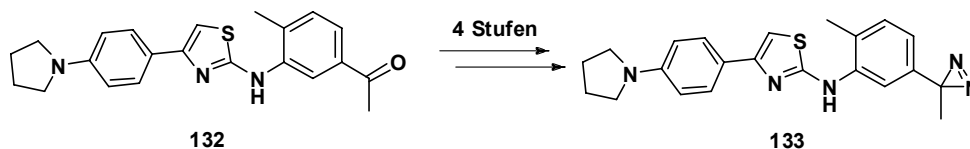


**Abb. 48:** Zerfall des Diazirins und Insertion in eine C–H-Bindung.

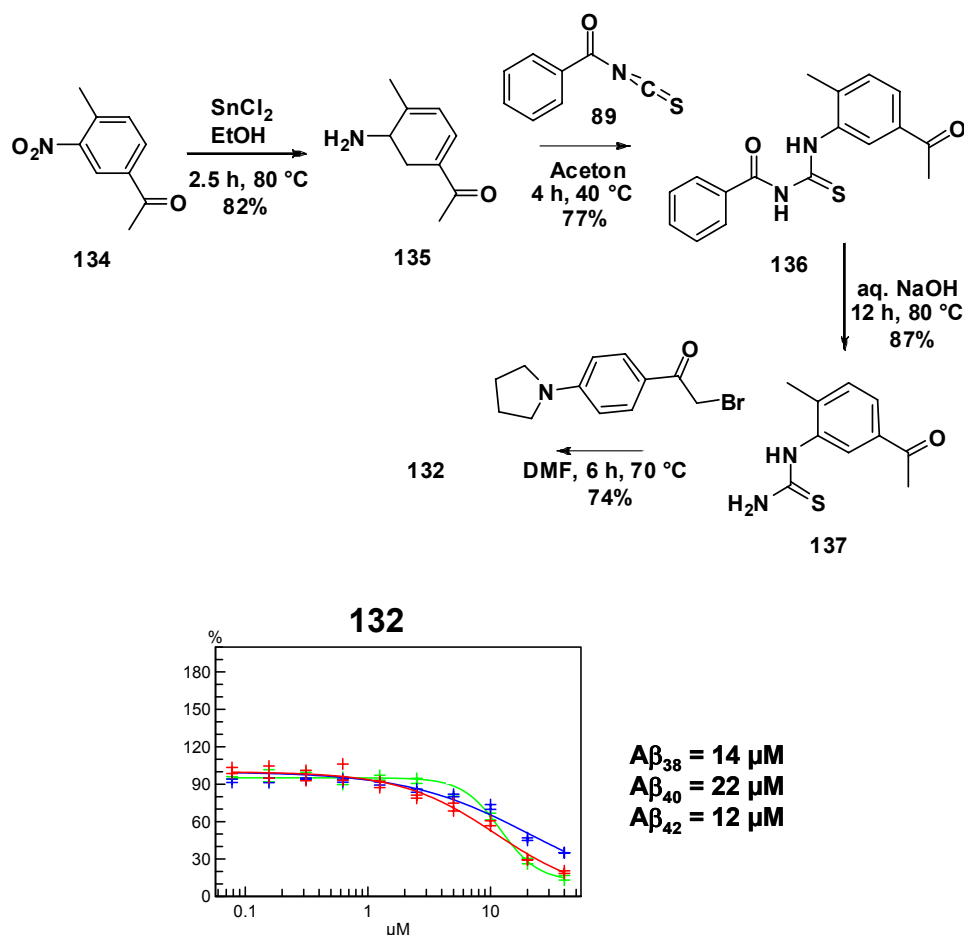
Diazirine lassen sich in einer Vierstufensynthese ausgehend von Ketonen (**127**) aufbauen (s. Abb. 49). Die Synthese verläuft über ein Oxim (**128**), welches anschließend tosyliert wird. Um das Diaziridin **130** zu generieren, wird das Tosyloxim **129** schließlich mit flüssigem Ammoniak umgesetzt. Die folgende Oxidation mit Iod unter basischen Bedingungen liefert das Diazirin **131**. Das Diazirin zerfällt bei sichtbarem Licht, daher muss die Reaktion in einem Dunkellabor unter Verwendung einer Rotlichtlampe erfolgen. Die Lagerung der Substanzen erfolgt bei –20 °C.

Abb. 49: Synthese des Diazirins **131**

Um einen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor mit einer photolabilen Gruppe zu versehen, muss zunächst untersucht werden, an welcher Stelle die Photogruppe im Molekül platziert werden kann, ohne dass dabei die Hemmwirkung auf das Enzym beeinflusst wird. Die Verbindung **107** (BSc3009, s. Kap. 3.2.3) zeigt sehr potente IC<sub>50</sub>-Werte und wurde daher für die Einführung der photoreaktiven Gruppe ausgewählt. Der Pyrrolidinring scheint entscheidend für die Aktivität zu sein; der Photolinker muss demnach an der „rechten“ Seite eingeführt werden. Dazu wurde der Diethylaminsubstituent von **107** durch ein Methylketon ersetzt, aus dem sich dann das Diazirin aufbauen lassen sollte (s. Abb. 50).

Abb. 50: Einführung des Diazirins in den  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor **132**

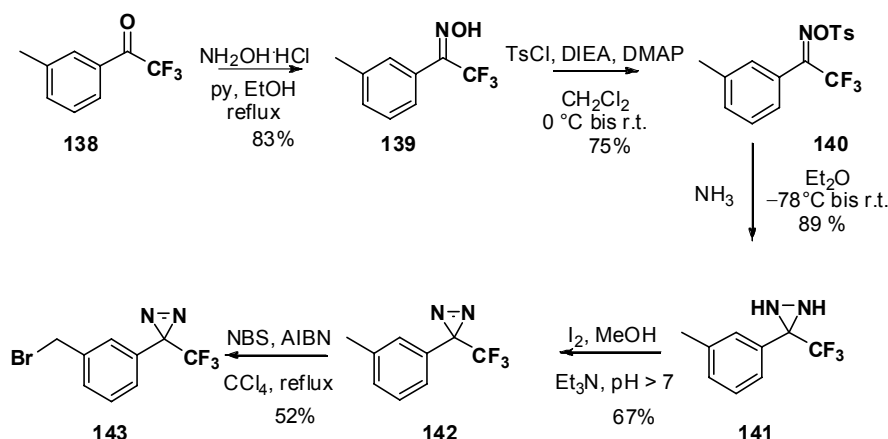
Das Thiazolylamin **132** wurde ausgehend von 1-(4-Methyl-3-nitrophenyl)ethanon nach dem folgenden Reaktionsschema in guten Ausbeuten hergestellt und im LPECL-Assay getestet. Die Verbindung zeigt potente Hemmwerte (s. Abb. 51).



**Abb. 51:** Synthese der Verbindung **132** und Ergebnisse aus dem LPECL-Assay

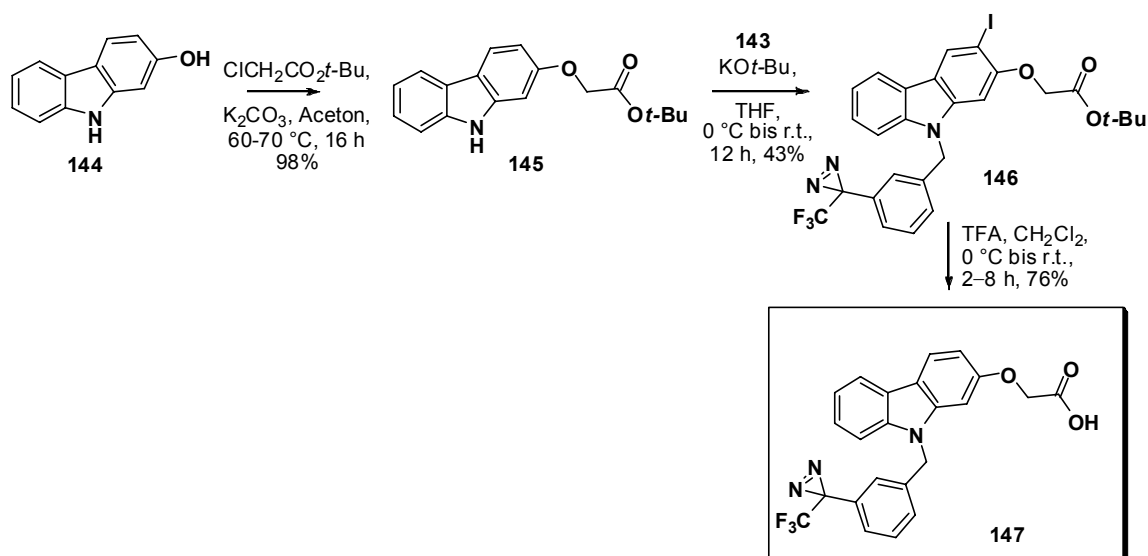
Bei den folgenden Versuchen, das Diazirin **133** ausgehend vom Methylketon **132** aufzubauen, kam es allerdings zu Schwierigkeiten. Die Reaktion des Tosyloxims zum Diaziridin lieferte zahlreiche Nebenprodukte und die Syntheseroute musste verworfen werden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde im folgenden Ansatz entschieden, den Diazirinbaustein separat aufzubauen. Dies hat den Vorteil, dass sich das fertige Label durch eine einfache nukleophile Substitution beliebig in aktive Substanzen einbauen lässt. Dazu wurde der kommerziell erhältliche Baustein **138** ausgewählt und die Synthese des Diazirins **142** erfolgte gemäß Abb. 52 in Anlehnung an die Literatur in guten Ausbeuten.<sup>[270]</sup> Die Bromierung der Methylgruppe durch NBS und katalytische Mengen an AIBN in Tetrachlorkohlenstoff liefert das Photolabel **143** in 52% Ausbeute.



**Abb. 52:** Synthese des photoaktivierbaren Bausteins **143**

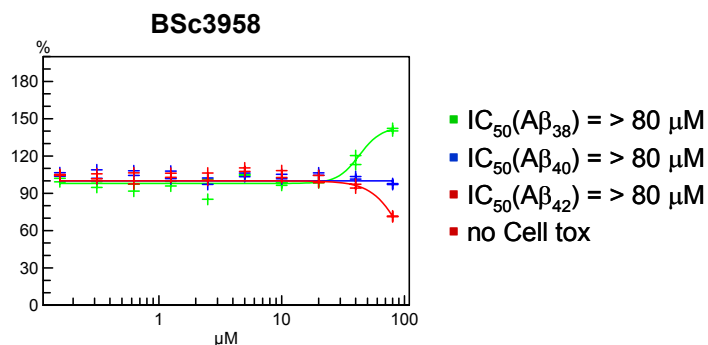
Bisherige Arbeiten im Arbeitskreis von Prof. Schmidt zeigten, dass das Carbazolgrundgerüst an der Aminfunktionalität mit lipophilen Resten wie Alkyl- oder Arylsubstituenten versehen werden kann und so eine  $\gamma$ -Sekretease-Modulation bewirkt. Der hergestellte Baustein **143** wurde daher nach folgendem Reaktionsschema in das Carbazol **144** eingebaut (s. Abb. 53).



**Abb. 53:** Einbau des Diazirinlabes in Carbazol

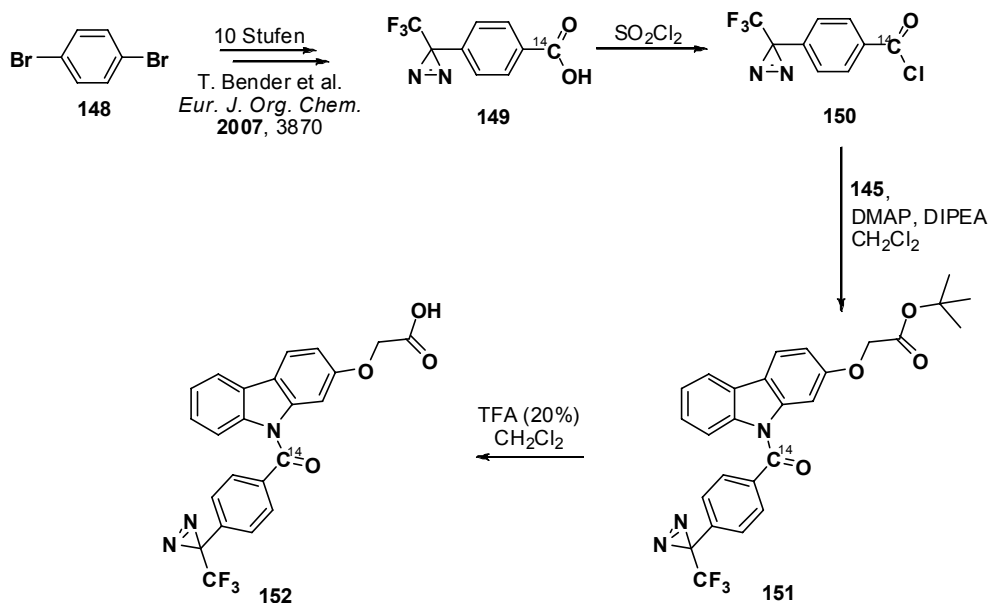
Die Substanz **147** (BSc3958) wurde bei Roche auf ihre Aktivität untersucht und das Ergebnis ist in Abb. 54 dargestellt. Der modulierende Effekt ist zwar erkennbar, tritt allerdings erst bei Konzentration über 80  $\mu$ M auf. Folgende Studien im Arbeitskreis Schmidt am Grundgerüst Carbazol bestätigten, dass *meta*-substituierte Aromaten, die am Heteroatom eingeführt werden, nur einen schwachen modulierenden Effekt zeigen. *Ortho*- und *para*-substituierte Aromaten weisen einen deutlichen höheren Hemmeffekt auf.





**Abb. 54:** Ergebnisse der LPECL-Untersuchung

Mit der Darstellung von **143** ist es gelungen, ein Photolabel aufzubauen, das sich zum Einbau in beliebige Strukturen eignet. Weitere Studien sind notwendig, um einen im mikromolaren Bereich aktiven Hemmstoff zu entwickeln, der dann in Markierungsexperimenten untersucht werden kann. Interessant ist auch die Synthese der radioaktiv markierten Verbindung **152**, die das Diazirin in *para*-Stellung trägt und daher möglicherweise den gewünschten stark modulierenden Effekt zeigt.



**Abb. 55:** Synthese des *para*-substituierten, radioaktiv markierten potentiellen  $\gamma$ -Sekretase-Modulators **152**

### 3.6 Aggregationsinhibitoren

Ein weiterer Ansatz um die Ursachen der Alzheimer Krankheit zu verstehen und eine Kausaltherapie zu entwickeln, ist die Untersuchung der Wechselwirkungen von kleinen organischen Verbindungen mit den Proteinablagerungen A $\beta$  und Tau. Wünschenswert sind dabei Substanzen, die in den Prozess der Proteinaggregation selektiv eingreifen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einer Forschungskollaboration mit Luis Serrano am EMBL Heidelberg ein einfach anwendbares und kostengünstiges Screening entwickelt werden, das Substanzen mit anti-amyloidogener Wirkung identifiziert. Die Arbeitsgruppe von Luis Serrano untersucht die Beziehung zwischen Aminosäuresequenz und Amyloid-Fibrillenbildung. Basierend auf experimentellen Daten wurde ein Sequenzmuster entwickelt, das Hexapeptidsequenzen eines Peptids identifiziert, die essentiell für die Amyloid-Bildung sind. Dieses Sequenzmuster basiert auf der Grundlage, dass die Amyloidogenität eines Proteins auf einem kurzen Proteinabschnitt lokalisiert ist und bestimmte Eigenschaften für diese Amyloidogenität verantwortlich sind.<sup>[271, 272]</sup> Für das A $\beta_{42}$ -Peptid identifizierte dieses Muster die Sequenz  $_{16}\text{KLVFFA}_{21}$  und experimentelle Daten bestätigten die Fähigkeit zur Fibrillenbildung und eine vergleichbare Toxizität.

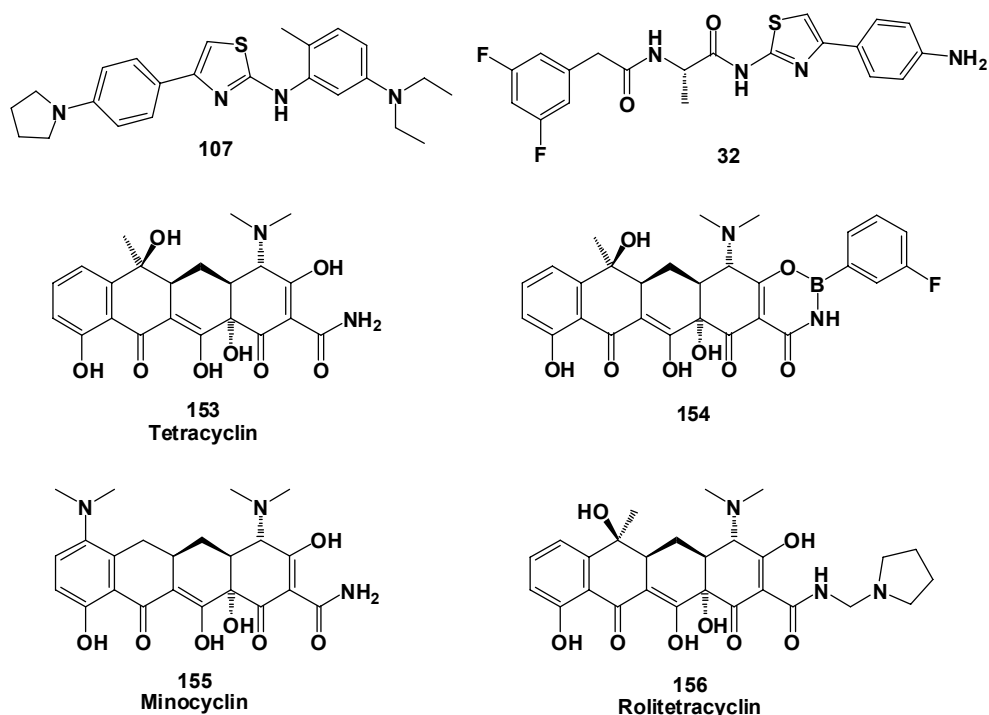
In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass kleine organische Moleküle in der Lage sind, die Oligomerisierung und daraus resultierende Toxizität des Tau-Proteins aufzuhalten.<sup>[215]</sup> Weiterhin wurden die Inhibitoreigenschaften von Curcumin-abgeleiteten Pyrazolen und Isoxazolen gegenüber der Tau- und A $\beta$ -Aggregation untersucht. Zudem wurde die Wirkung auf die A $\beta$ -Sekretion untersucht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese Verbindungsklassen mehrere Targets in den mit der AD verbundenen Signalwegen haben.<sup>[220]</sup>

Studien mehrerer Arbeitsgruppen identifizierten frühe Intermediate der Fibrillenbildung als verantwortlich für die amyloid-induzierte Toxizität. Daher ist es sowohl wünschenswert, Verbindungen zu finden, die diesen frühen Prozess unterdrücken, oder die bereits gebildete Fibrillen wieder auflösen. Potente Hemmstoffe sollen weiterhin auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die Aggregation der Vollängen-Peptide bzw. Proteine (A $\beta_{42}$ -Peptid und Tau-Protein) zu unterdrücken. Diese Strategie lässt eine hohe Erfolgsrate erwarten; zudem weisen die Hexapeptidsequenzen die Vorteile einer einfachen Handhabung sowie geringere Kosten auf. Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Peptid und organischem Molekül lassen sich so grundlegend studieren. Es stellen sich zwei Fragen:

1.) Sind die Verbindungen in der Lage, die Fibrillenbildung zu unterdrücken? 2.) Können durch die Strukturen bereits gebildete Fibrillen wieder aufgelöst werden? Zur Beantwortung werden daher zwei Untersuchungen durchgeführt: in den so genannten Blockierungsexperimenten (*arresting*) wird die Fähigkeit der Verbindungen untersucht, die frühe Aggregation zu unterdrücken. In den Auflösungsexperimenten (*disassembling*) wird untersucht, ob die Verbindungen in der Lage sind, bereits gebildete Fibrillen wieder aufzulösen. Gleichzeitig wurde die Selektivität der Verbindungen in Bezug auf verschiedene zur Aggregation neigende Hexapeptidsequenzen (A $\beta$ , Tau, Cystatin und ein *de novo* Peptid nämlich STVIIIE<sup>[271, 273]</sup> untersucht. Zudem erfolgt eine Testung der Substanzen bezüglich ihrer anti-amyloidogenen Wirkung auf das Tau-Protein und das A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptid. Die Wirkung auf die Toxizität von A $\beta$ <sub>42</sub> wurde in menschlichen Neuroblastoma SH-SY5Y Zellen untersucht.

### 3.6.1 Blockierungs- und Auflösungsexperimente mit der A $\beta$ -Hexapeptidsequenz

In einem ersten Screening wurde zunächst eine Auswahl von kleinen organischen Verbindungen (**32**, **107**, **153–156**, s. Abb. 56) auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Fibrillenbildung untersucht. Für Tetracyclin (**153**) wurde bereits eine anti-amyloidogene Wirkung festgestellt und für die Derivate Minocyclin (**155**) und Rolitetracyclin (**156**) sind diese Eigenschaften ebenfalls beschrieben.<sup>[274]</sup> Die Verbindung **154** ist ein Kondensationsprodukt aus Tetracyclin und Phenylboronsäure und wurde ursprünglich als Antitumor-Wirkstoff postuliert.<sup>[275]</sup> Wie schon in Kapitel 3.2 beschrieben, sind die Verbindungen **107** und **32** (Abb. 56) in der Lage, die A $\beta$ -Spiegel zu verändern; der vorliegende Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Beide Verbindungen weisen eine hohe Lipophilie auf und könnten daher in der Lage sein, an fibrilläre Strukturen zu binden und so die Substratumsetzung der  $\gamma$ -Sekretase zu beeinflussen. Die Verbindung **107** ist ein naher Verwandter der Thiazolylamine aus der Torrey Pines-Serie mit  $\gamma$ -Sekretase-inhibierender Eigenschaft (IC<sub>50</sub> (A $\beta$ <sub>42</sub>) = 3.2  $\mu$ M).<sup>[178]</sup> Um die anti-amyloidogene Fähigkeit der ausgewählten Verbindungen zu untersuchen, wurde zunächst die amyloidogene Sequenz des A $\beta$ -Peptides <sub>16</sub>KLVFFA<sub>21</sub> verwendet.<sup>[271]</sup> Das amyloidogene Verhalten dieses Fragments wurde *in vitro* durch Thioflavin-T-Bindung, Circular dichroismus (CD) Spektroskopie und Elektronenmikroskopie (EM) bestätigt.

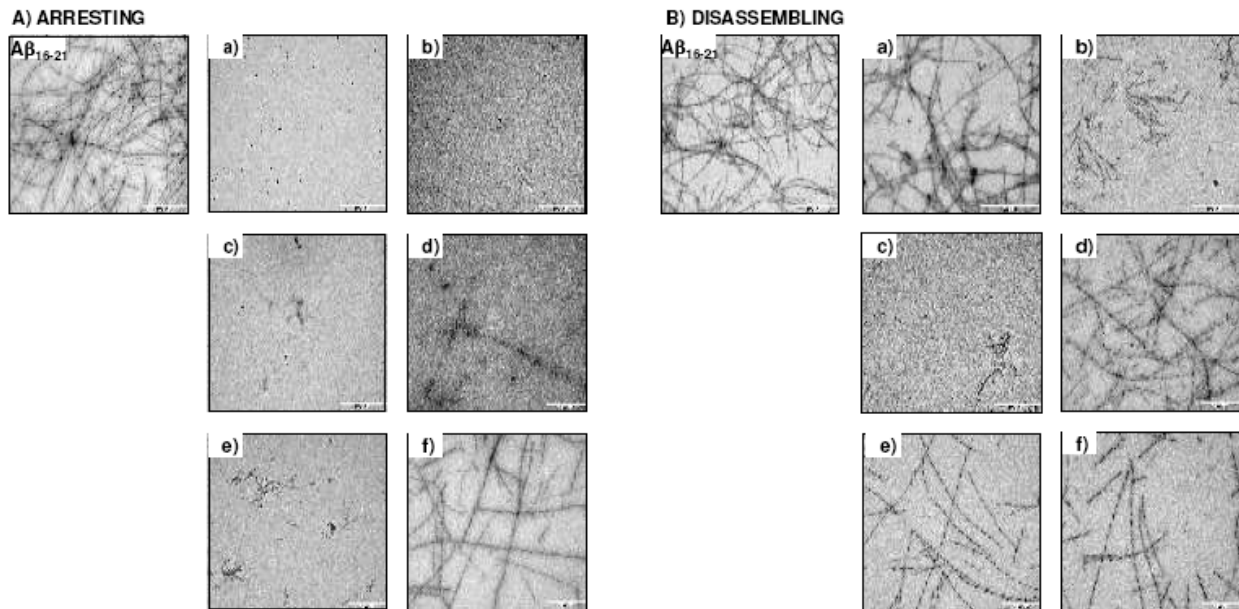


**Abb. 56:** Auswahl an kleinen organischen Verbindungen

Die Verbindungen wurden sowohl in den Blockierungs- und Auflösungsexperimenten mit einem Fibrillen-/Inhibitor-Verhältnis von 5:1 untersucht. Die Co-Inkubation der A $\beta$  Hexapeptide mit den Verbindungen **32**, **107**, **153–156** für 7 d bei Raumtemperatur (*assembling*) reduzierte signifikant die Fibrillenbildung, was durch die EM-Analyse im Vergleich mit dem Kontrollexperiment beobachtet wurde (Abb. 57). Die Verbindungen hemmen nicht nur die A $\beta$ -Hexapeptidfibrillenbildung, sondern weisen auch eine defibrillogene Wirkung gegen bereits gebildete A $\beta$ -Hexapeptidfibrillen auf. Hierfür wurden die Hexapeptide alleine für 7 d bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurden die Verbindungen **32**, **107**, **153–156** für weitere 7 d zugegeben (*disassembling*). In allen Experimenten wurden zwar Fibrillen nach der Inkubation beobachtet, allerdings war die Menge sowie die Morphologie drastisch reduziert. In einigen Fällen zersetzten die Verbindungen das Fibrillenmaterial in runde Partikel, die in der EM-Analyse löslichem Peptid glichen.

Die Tetracyclinderivate **153–156** zeigten wie erwartet einen starken anti-amyloiden Effekt in beiden Assays (Abb. 57). Tetracyclin **153** reduzierte dabei das Fibrillenmaterial signifikant. Das Borazol **156** ist in den Blockierungsexperimenten aktiv, seine fibrillenauflösende Eigenschaft ist jedoch im Vergleich zu Tetracyclin **153** reduziert (Abb. 57, Bc). Die Verbindung **107** hemmt die Fibrillenbildung (Abb. 57, Aa), depolymerisiert jedoch nicht bereits gebildete Aggregate (Abb. 57, Bf). Dies lässt darauf

schließen, dass die Verbindung **107** frühe Oligomere des Fibrillenbildungsprozesses stabilisiert. Die Verbindung **32** blockiert die Fibrillenbildung in den Blockierungsexperimenten und löst reife Fibrillen wieder auf. Dieser Effekt wird auch noch bei einem Fibrillen-/Inhibitor-Verhältnis von 10:1 beobachtet.



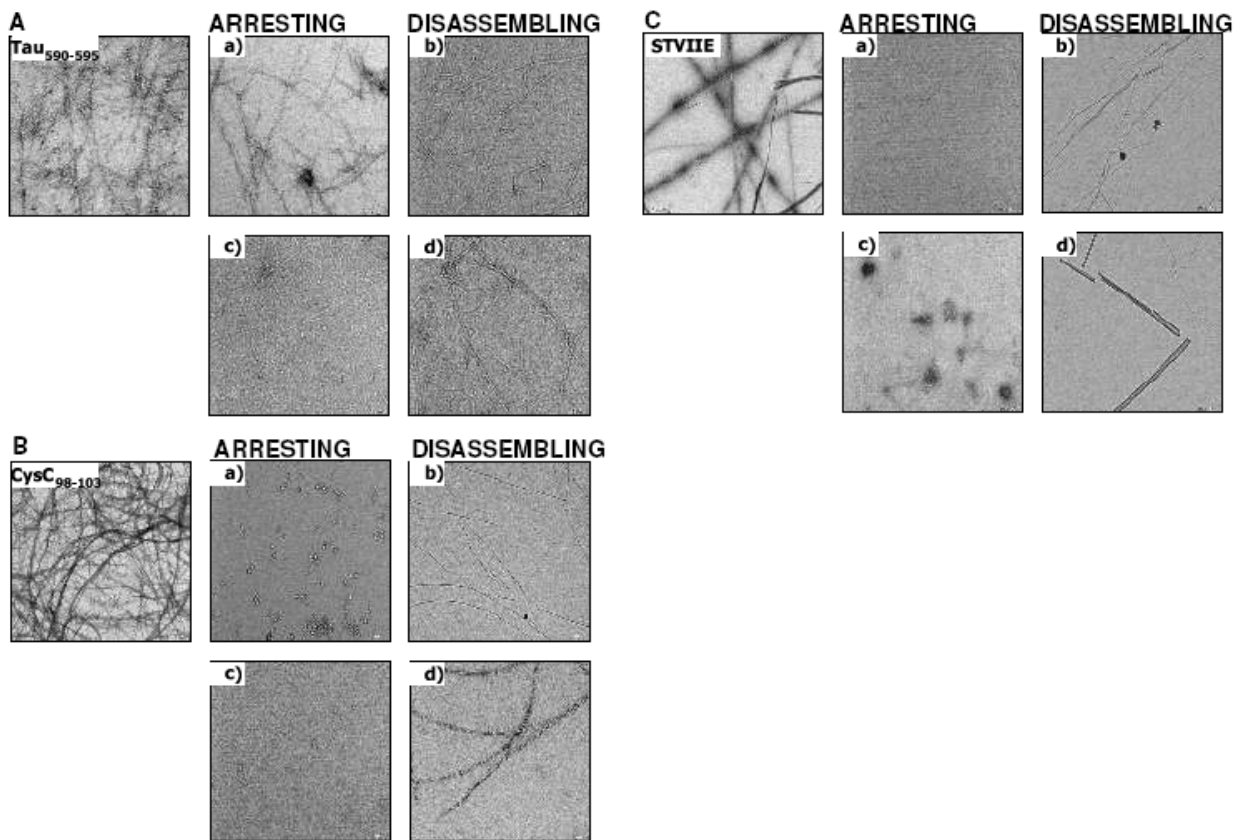
**Abb. 57:** Wirkung der Verbindungen **32**, **107**, **153–156** auf die Selbstaggregation von KLVFFA.  
**A) Arresting:** Inkubation des monomeren Peptids (1.5 mM, 7 d mit 30  $\mu$ M der Verbindungen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen (A $\beta$ <sub>16-21</sub>, KLVFFA) ohne Verbindung und mit **a)** Verbindung **107**, **b)** Verbindung **32**, **c)** Tetracyclin **153**, **d)** Verbindung **154**, **e)** Minocyclin **155**, **f)** Rolitetracyclin **156**. Bei **a)–e)** tritt eine signifikante Hemmung der Fibrillenbildung auf.  
**B) Disassembling:** Inkubation der bereits gebildeten Fibrillen mit den Verbindungen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen (A $\beta$ <sub>16-21</sub>, KLVFFA) ohne Verbindung und mit **a)** Verbindung **107**, **b)** Verbindung **32**, **c)** Tetracyclin **153**, **d)** Verbindung **154**, **e)** Minocyclin **155**, **f)** Rolitetracyclin **156**. Bei **b)** und **c)** tritt eine starke Fibrillenauflösung auf.

### 3.6.2 Aggregationshemmung weiterer amyloidogener Peptidsequenzen

Um die Selektivität der Verbindungen zu untersuchen, wurden zwei weitere Hexapeptidsequenzen von pathogenen amyloidogenen Proteinen ausgewählt: KVQIIN (Tau<sub>590–595</sub>) für das Tau-Protein und SFQIYA (CysC<sub>98–103</sub>) für Cystatin C. Zudem wurde das amyloidogene *de novo* Peptid STVIIIE untersucht.<sup>[273]</sup> Die ausgewählten Sequenzen folgen dem Amyloidsequenzmuster und weisen die selbe Zelltoxizität auf wie die Volllängen-Proteine.<sup>[73, 273]</sup> Die Verbindungen **107** und **32** zeigten im A $\beta$ -Peptidassay bei einem Fibrillen-/Inhibitor-Verhältnis von 5:1 mit der Hexapeptidsequenz die höchste Aktivität, daher wurde dieselben Bedingungen für die Blockierungs- und Auflösungsexperimente mit KVQIIN, SFQIYA und STVIIIE gewählt.

Im Blockierungsexperiment wurde die Fibrillenbildung durch die Verbindungen **107** und **32** signifikant reduziert, was der Vergleich mit der Kontrolle zeigte (Abb. 58). Statt glatten,

länglichen Fibrillen traten runde Partikel auf, insbesondere bei der CysC-Sequenz (Abb. 58, Ca,c). Bei der Tau-Sequenz war die Wirkung der Verbindung **32** stärker als die der Verbindung **107** (Abb. 58, Aa,c). Die Fibrillenbildung der STVIIIE-Sequenz wurde von beiden Verbindungen signifikant reduziert (Abb. 58, Ca,c). In den Auflösungsexperimenten wurden die Fibrillen durch die Einwirkung der Verbindungen **107** und **32** unabhängig von der Hexapeptidsequenz reduziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Mechanismus der Hemmung der Fibrillenbildung nicht allein von der Aminosäuresequenz anhängig ist. Viel eher könnten Ähnlichkeiten in der strukturellen Reorganisation entscheidend sein.



**Abb. 58:** Wirkung der **107** und **32** auf die Selbstaggregation von KVQIIN, SFQIYA und STVIIIE.

**A) Arresting und disassembling:** Inkubation des monomeren KVQIIN-Peptids (350  $\mu$ M, 7 d) mit **a)** Verbindung **107** (70  $\mu$ M) und **b)** Verbindung **32** (70  $\mu$ M). Inkubation von gebildeten Fibrillen (350  $\mu$ M) mit **c)** Verbindung **107** (70  $\mu$ M) und **d)** Verbindung **32** (70  $\mu$ M). Bei **b)–d)** tritt eine starke Hemmung der Fibrillenbildung auf.

**B) Arresting und disassembling:** Inkubation des monomeren SFQIYA-Peptids (1 mM, 7 d) mit **a)** Verbindung **107** (200  $\mu$ M) und **b)** Verbindung **32** (200  $\mu$ M). Hemmung der gebildeten Fibrillen (200  $\mu$ M) mit **c)** Verbindung **107** (200  $\mu$ M) und **d)** Verbindung **32** (200  $\mu$ M). Bei **a)–c)** tritt eine starke Hemmung der Fibrillenbildung auf.

**C) Arresting und disassembling:** Inkubation des monomeren STVIIIE-Peptids (500  $\mu$ M, 7 d) mit **a)** Verbindung **107** (100  $\mu$ M) und **b)** Verbindung **32** (100  $\mu$ M). Inkubation von gebildeten Fibrillen (500  $\mu$ M) mit **c)** Verbindung **107** (100  $\mu$ M) und **d)** Verbindung **32** (100  $\mu$ M). Bei **a)–d)** tritt eine starke Hemmung der Fibrillenbildung auf.

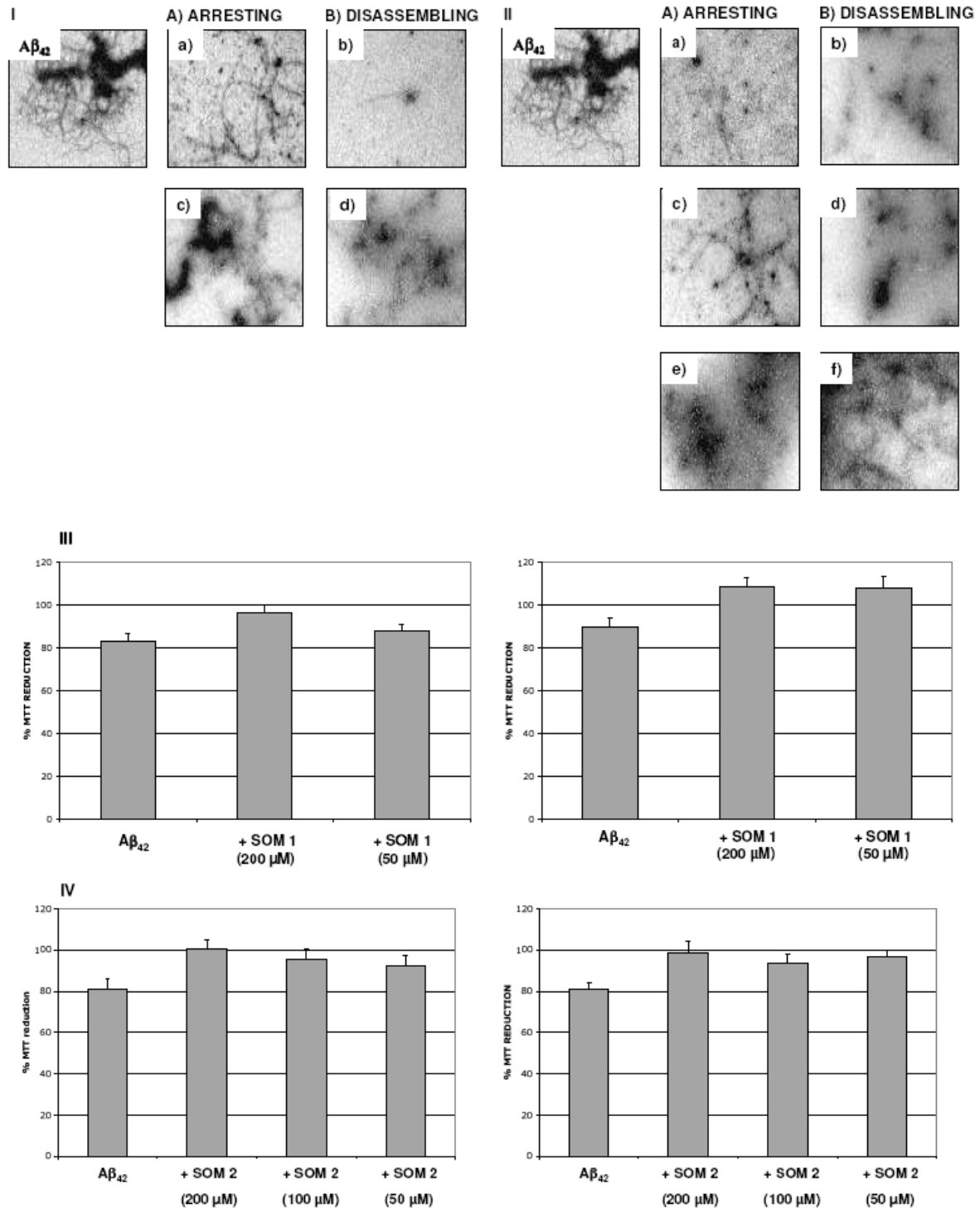
### 3.6.3 Hemmung der A $\beta$ <sub>42</sub>-Aggregation

Um auszuschließen, dass die Hemmung der Fibrillenbildung und die Fibrillenauflösung nur bei den Hexapeptidsequenzen auftreten, wurde die Wirkung der Verbindungen **107** und **32** auf die Fibrillenbildung des A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptids untersucht. Dazu wurden die Verbindungen **107** und **32** in Blockierungs- und Auflösungsexperimenten in unterschiedlichen Fibrillen/Inhibitor-Verhältnissen (2:1, 1:1, 1:2) untersucht. Zusätzlich wurde die von A $\beta$ <sub>42</sub> hervorgerufene Toxizität in menschlichen Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y) mittels eines 3-(4,5-Dimehtylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assays (MTT-Assay) untersucht. Bei den Blockierungsexperimenten wiesen beide Verbindungen die stärkste Hemmwirkung bei einem Fibrillen/Inhibitor-Verhältnis von 2:1 auf. Die Wirkung der Verbindung **32** war dabei stärker als die der Verbindung **107** (Abb. 59, IAa/IIAa). Die Beobachtung der A $\beta$ <sub>42</sub>-induzierten Toxizität bestätigt die konzentrationsabhängige Wirkung (Abb. 59, III und IV, links).

Bei den Auflösungsexperimenten ist bei den Verbindungen ein unterschiedliches Verhalten in der EM-Analyse und bei der Toxizitätsuntersuchung zu erkennen: Verbindung **107** löst bereits bestehende Fibrillen auf und verhindert deren toxische Wirkung; Verbindung **32** zeigt nur eine schwache fibrillenauflösende Wirkung, verhindert aber ebenfalls die toxische Wirkung. (Abb. 59, IB/IIB und III, IV, rechts).

Die anti-amyloidogene Wirkung für A $\beta$ <sub>42</sub> der Verbindungen **153**, **155** und **156** sind in der Literatur schon hinreichend beschrieben und wurden daher nicht weiter untersucht.<sup>[274]</sup>

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Verbindung **32** bei den Blockierungsexperimenten eine bessere Wirkung zeigte, und es wird angenommen, dass sie die Keimbildung oder Bildung von frühen Oligomeren unterdrücken kann. Verbindung **107** unterdrückte die Keimbildung sowie die Neubildung von Fibrillen bei der getesteten Konzentration, wies aber eine weniger starke Wirkung hinsichtlich der Auflösung bereits bestehender Fibrillen auf.



**Abb. 59:** Wirkung der Verbindungen **107** und **32** auf die Selbstaggregation von Aβ<sub>42</sub>.

**I:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Aβ<sub>42</sub>-Fibrillen (100 μM) ohne und mit Verbindung **107**; **a)** Arresting, 200 μM; **b)** Disassembling, 200 μM; **c)** Arresting, 50 μM; **d)** Disassembling, 50 μM.

**II:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Aβ<sub>42</sub>-Fibrillen (100 μM) ohne und mit Verbindung **32**; **a)** Arresting, 200 μM; **b)** Disassembling, 200 μM; **c)** Arresting, 100 μM; **d)** Disassembling, 100 μM; **e)** Arresting, 50 μM; **f)** Disassembling, 50 μM.

**III, IV:** SH-SY5Y-Überlebensrate nach Zugabe von **107** und **22**; links: Blockierungsexperimente; rechts: Auflösungsexperimente.



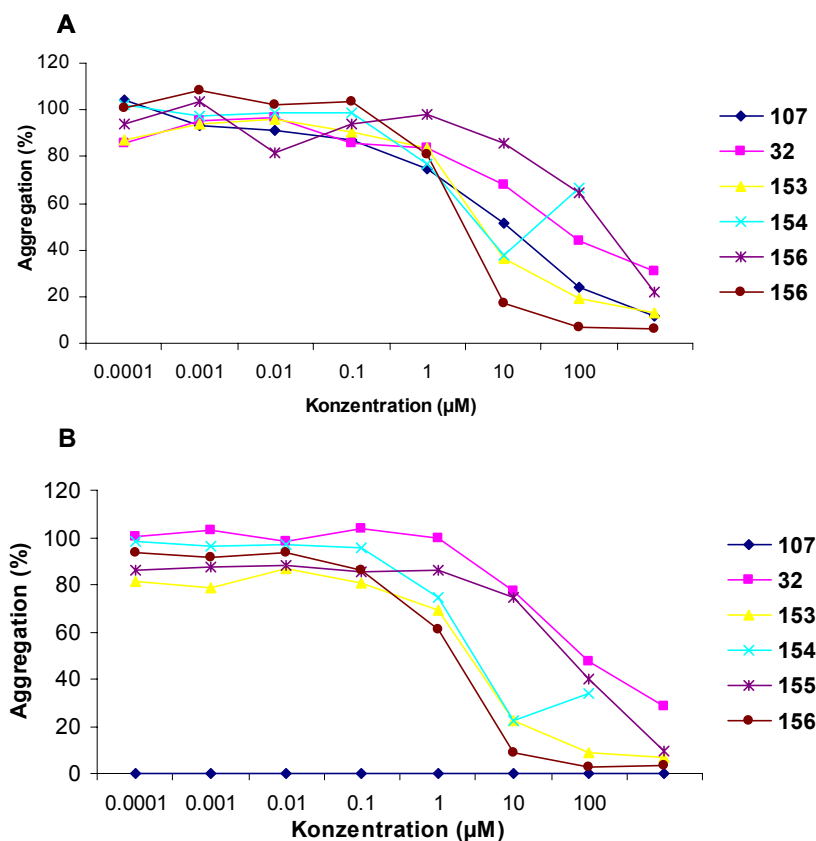
### 3.6.4 Hemmung der Tau-Aggregation

Die bei der AD-Pathologie auftretenden Tau-Fibrillen korrelieren in ihrer Anzahl besser als die A $\beta$ -Fibrillen mit dem Fortschreiten der Demenz.<sup>[276, 277]</sup> Verminderte Tau-Spiegel verhindern Verhaltensauffälligkeiten bei transgenen Mäusen, die APP überexprimieren. Die hohen A $\beta$ -Spiegel werden dabei nicht reduziert.<sup>[278]</sup> Zahlreiche Tau-Aggregationsinhibitoren wurden entwickelt und einige zeigen eine gute Wirkung in Zellassays.<sup>[216, 217, 219]</sup> Weiterhin wurde gezeigt, dass Verbindungen, die die A $\beta$ -Aggregation hemmen auch eine Wirkung auf die Tau-Aggregation haben können.<sup>[279]</sup> Daher wurden die Verbindungen **32**, **107**, **153–156** auch auf die Tau-Aggregation und PHF-Depolymerisation in einem zellfreien Assay untersucht. Dazu wurde ein Assay gewählt, das auf einem Fluoreszenzwechsel des aggregationspezifischen Farbstoffs von Thioflavin S (ThS) basiert

Der biologische Test basiert auf einem Aggregations-Assay, welcher die Tatsache ausnutzt, dass der Farbstoff Thioflavin-S (ThS) seine spektralen Eigenschaften während der Aggregation von Tau verändert.<sup>[216, 219]</sup> In Tabelle 8 und in Abb. 60 sind die Werte der Hemmung der Tau-Aggregation (IC<sub>50</sub>-Werte) bzw. die Werte zur Aktivität Tau-Aggregate wieder aufzulösen (DC<sub>50</sub>-Werte) zusammengefasst. Nahezu alle Verbindungen zeigten eine starke Hemmung der Tau-Aggregation. Zudem wurden bereits bestehende Tau-Aggregate wieder aufgelöst. Die stärkste Wirkung war dabei mit Tetracyclin **153**, dem Boroxazol **154** und Rolitetetracyclin **156** im unteren mikromolaren Bereich zu beobachten (z.B. **154**, IC<sub>50</sub> = 3.0  $\mu$ M, DC<sub>50</sub> = 2.4  $\mu$ M, Tabelle 8). Abb. 60 zeigt die dosis-abhängige Wirkung für die Hemmung (**A**) und die Auflösung von gebildeten PHFs (**B**). Die Kurven zeigen eine signifikante Abnahme von aggregiertem Protein bei steigender Verbindungskonzentration, wobei die Substanz **156** jeweils den stärksten Hemmeffekt zeigt.

**Tabelle 8:** Biologische Aktivität der Verbindungen **32**, **107**, **153–156**. Angegeben ist die Inhibition der Tau-Aggregation und der PHF-Depolymerisation- (IC<sub>50</sub>- bzw. DC<sub>50</sub>-Werte).

Verbindung	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	DC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>107</b>	8.4	26
<b>32</b>	41	47
<b>153</b>	5.6	2.7
<b>154</b>	3.0	2.4
<b>155</b>	89	39
<b>156</b>	2.7	1.5



**Abb. 60:** Dosis-abhängige Wirkung der Verbindungen **32**, **107**, **153–156** (A) Hemmung der Tau-Aggregation. Der Grad der Aggregation wird über die Thioflavin-S-Fluoreszenz gemessen und in Prozent gegen die unbehandelte Kontrolle angegeben. (B) PHF-Depolymerisation.

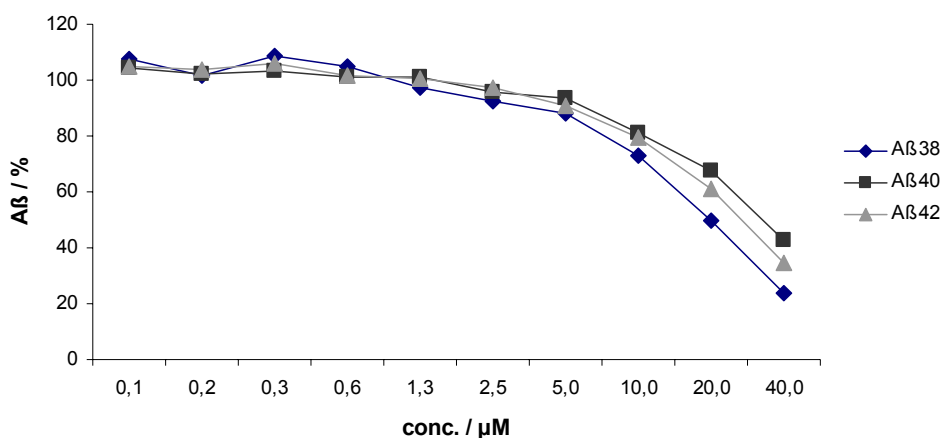
### 3.6.5 Hemmung der A $\beta$ -Sekretion

Kürzlich zeigten Schmidt et al. dass von Curcumin abgeleitete Pyrazole und Isoxazole sowohl die A $\beta$ -Sekretion hemmen als auch die Fibrillenbildung von A $\beta_{42}$ - und Tau-Aggregation unterdrücken.<sup>[279]</sup> Liganden von A $\beta$  zeigen eine höhere Wahrscheinlichkeit mit dem APP-Metabolismus zu interferieren. Dies könnte mit der APP-Anbindung zusammenhängen.<sup>[204]</sup> Um dies zu überprüfen, wurde neben den Verbindungen **32** und **107** die Verbindung **153–156** auf ihre Wirkung auf die A $\beta$ -Sekretion in dem zell-basierten LPECL-Assay untersucht. Für die Verbindungen **107** und **32** wurde bereits eine starke Hemmung der A $\beta$ -Sekretion gezeigt (Ergebnisse s. Kap. 3.2). Doch auch die Verbindung **154** zeigt eine effektive Hemmung der A $\beta$ -Sekretion (Tabelle 9). Die dosisabhängige Wirkung ist in Abbildung 61 dargestellt. Die Verbindungen unterdrücken die Bildung von A $\beta_{38,40,42}$  schon bei mikromolekularen Konzentration (z.B. **107**, IC<sub>50</sub>  $\leq$  3.2  $\mu$ M). Trotz der nahen Verwandtschaft zur Serie von Torrey Pines weist die Verbindung **107** eine Inhibition und keine Modulation der  $\gamma$ -Sekretase

auf. Das Boroxazol **154** hemmt im Gegensatz zum nahe verwandten Tetracyclin (**153**) die A $\beta$ -Sekretion signifikant (z.B. IC<sub>50</sub>(A $\beta$ <sub>42</sub>) = 26.2  $\mu$ M, Tabelle 9). Minocyclin (**155**) weist eine schwache Wirkung auf die A $\beta$ <sub>38</sub>-Hemmung auf und für die Verbindungen **153** und **156** konnte keine Wirkung beobachtet werden.

**Tabelle 9:** Aktivitäten der Verbindungen **32**, **107**, **153–156** auf die A $\beta$ -Sekretion.

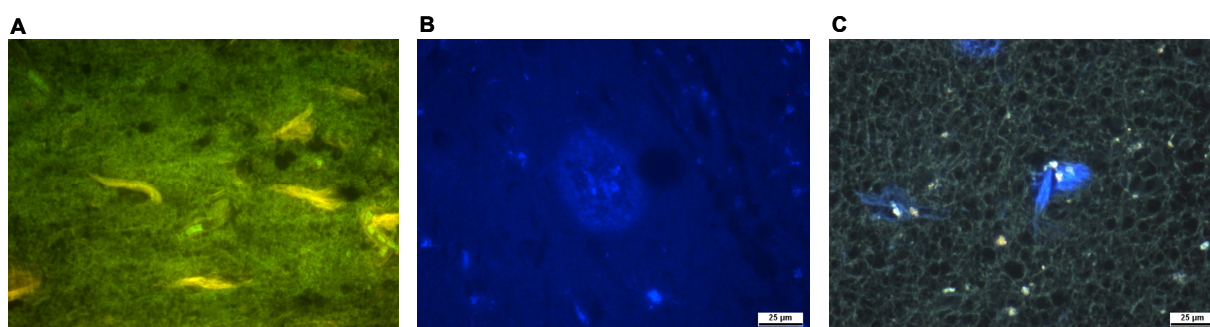
Verbindung	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)			Zelltoxizität ( $\mu$ M)
	A $\beta$ <sub>38</sub>	A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub>	
<b>107</b>	3.1	3.4	3.2	>80
<b>32</b>	1.7	2.3	2.5	>40
<b>153</b>	>40	>40	>40	>40
<b>154</b>	19.2	32.8	26.2	>40
<b>155</b>	30.4	>40	>40	>40
<b>156</b>	>40	>40	>40	>40



**Abb. 61:** Dosis-abhängige Wirkung auf die A $\beta$ -Sekretion der Verbindung **154** (♦ - A $\beta$ <sub>38</sub>, ■ - A $\beta$ <sub>40</sub>, ▲ - A $\beta$ <sub>42</sub>).

### 3.6.6 Histologische Studien

Die untersuchten Tetracycline weisen eine hohe Affinität zu den fibrillären Strukturen auf. Aufgrund der Tatsache, dass das Tetracyclin-Grundgerüst fluoreszierende Eigenschaften aufweist, könnten diese Verbindungen als Reagenzien in der histologischen Untersuchung von einer *post mortem* aus dem Ammonshorn (Hippocampus) entnommenen Gewebeprobe eines Alzheimer-Patienten eingesetzt werden. Hierzu werden die Gehirnschnitten von Alzheimer-Patienten mit den Verbindung **153** und **154** untersucht. Dabei wurde das Standardprotokoll für die sonst übliche Thioflavinfärbung verwendet. Tetracyclin (**153**) färbt ebenso wie Thioflavin (Abb. 62, A) sowohl die extrazellulären A $\beta$ -Plaques als auch die intrazellulären Tau-Tangles (Abb. 62, B). Die Verbindung **154** färbt die Tangles intensiv; die Plaques sind jedoch nur schwach gefärbt. Zudem weist die Färbung **154** eine deutliche Farbabgrenzung zum Hintergrund auf (Abb. 62, C) und erleichtert somit bei der histologischen Untersuchung das Auffinden von befallenem Gewebe.



**Abb. 62:** histochemische Färbung von Gehirnschnitten aus dem Ammonshorn (Hippocampus) von Alzheimer-Patienten aufgenommen mit einem Fluoreszenzmikroskop. (A) mit Thioflavin angefärbte Tangles; (B) mit Tetracyclin (**153**) angefärbter Plaque; (C) mit **154** angefärbte Tangles.

Die extrazellulären, runden Plaques bestehen hauptsächlich aus A $\beta$ , die fibrillären Tau-Tangles befinden sich im Soma der Nervenzellen. Der Hintergrund wird von normalen Zellen gebildet, die keine für die pathologischen Läsionen spezifischen Fluoreszenzsignale zeigen.

### 3.6.7 Diskussion

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die untersuchten Verbindungen die A $\beta$ -Sekretion hemmen können, an die Fibrillen binden oder die Fibrillenbildung von Hexapeptidsequenzen und fibrillärem A $\beta_{42}$  unterdrücken. Zudem sind die Verbindungen in der Lage, die von A $\beta_{42}$  induzierte Toxizität in Zellkulturen zu unterdrücken. Der entwickelte Modellassay eignet sich, um Verbindungen mit anti-amyloidogener Wirkung zu identifizieren und stellt somit eine kostengünstige Alternative zu aufwändigeren Verfahren dar. Weiterhin nehmen alle

Verbindungen Einfluss auf die Tau-Aggregation und bewirken die Depolymerisation bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen. Dies deutet darauf hin, dass die Verbindungen zwei Hauptprozesse der AD beeinflussen: die A $\beta$ -und Tangle-Produktion sowie die Polymerisation. Die Verbindungen **107** und **32** wiesen dabei die stärksten Wirkungen auf: sie zeigten starke inhibitorische Effekte auf die A $\beta$ -Sekretion und schützten vor der A $\beta$ <sub>42</sub>-induzierten Toxizität in Zellkulturen. Die Verbindungen weisen dabei jedoch eine unterschiedliche Wirkung auf A $\beta$ <sub>42</sub> auf. Bei dem Blockierungsexperiment zeigt die Verbindung **107** eine gute Korrelation mit der Abnahme des amyloiden Materials und der Toxizität. Bei dem Auflösungsexperiment zeigen beide Verbindungen eine Wirkung auf die Toxizität, Verbindung **32** löste jedoch im Gegensatz zu Verbindung **107** die Fibrillen nicht wieder auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Verbindung **107** und **32** bei einer AD Therapie eine präventive Wirkung haben könnten.

Die Untersuchung der anti-amyloidogenen Wirkung der Verbindungen **32**, **107**, **153–156** lieferte multipotente Aggregationsinhibitoren. Dieses Ergebnis ist erst dann von großer Bedeutung, wenn eindeutig gezeigt werden kann, dass die Aggregation mehrerer Proteine bei der AD-Pathologie eine Rolle spielt. Der Hemmmechanismus scheint von der Aminosäuresequenz des beteiligten Peptids oder Proteins unabhängig zu sein; der genau vorliegende Ablauf ist jedoch nicht geklärt.

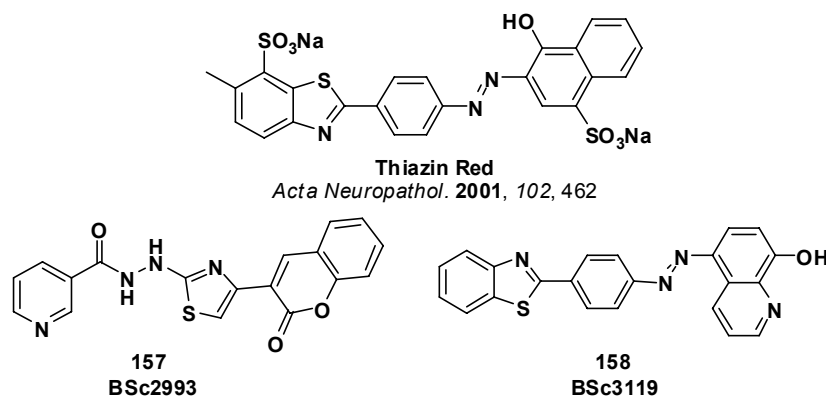
Für die Tetracyclinderivate konnte eine starke inhibitorische Wirkung beobachtet werden. An Huntington-Mäusen wurde gezeigt, dass Minocyclin (**155**) einen neuroprotektiven Schutz aufweist und die Blut-Hirn-Schranke überwindet.<sup>[280]</sup> Weiterhin binden die Verbindung **153** und **154** an extrazelluläre Plaques sowie an intrazelluläre Tangles und könnten aufgrund der fluoreszenten Eigenschaft einen Einsatz in der AD-Diagnostik ermöglichen. Die Verbindung **154** weist dabei eine höhere Affinität zu den Tangles auf und liefert ein sehr kontrastreiches Färbeargebnis. Die durchgeführten Studien zeigten, dass die Tetracyclinderivate und zwei potente  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (**107** und **32**) mehrere Targets in den AD-verbundenen Signalwegen aufweisen. Weitere Studien sowie die Wirkung auf die durch die Tau-Aggregation ausgelöste Toxizität in Zellkulturen sowie Tierversuche werden benötigt, um das Potenzial der Verbindungen und die genauen Mechanismen zu verstehen.

### 3.7 Fluoreszente PHF-Binder

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.6 veranlassten uns zu einer weiteren Untersuchung von fluoreszenten Verbindungen, die eine hohe Affinität zu PHFs aufweisen.

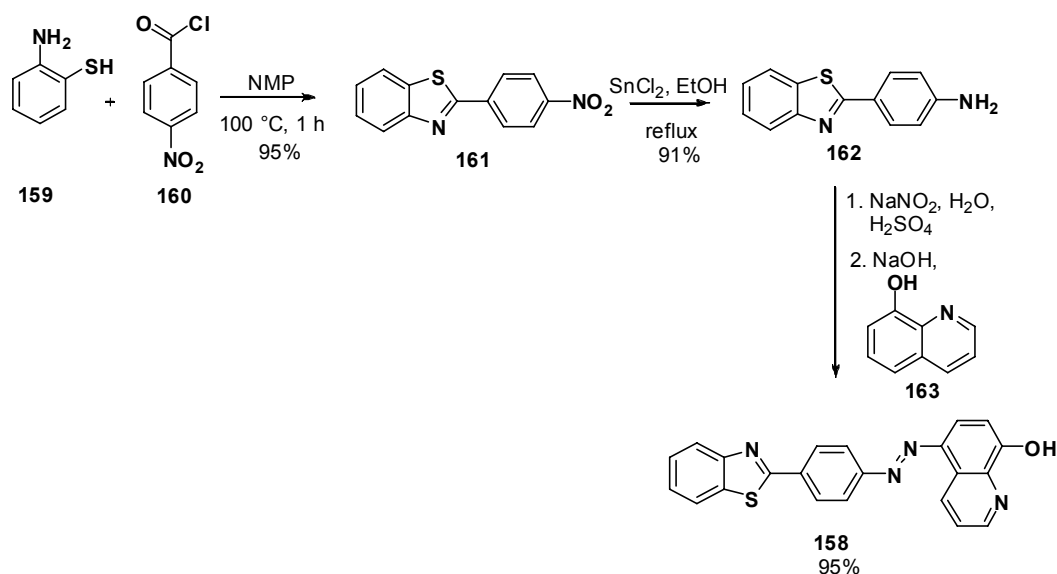
Für die histologische Untersuchung wurde daher die Verbindung **157** (BSc2993)<sup>[281]</sup> (Abb. 63) ausgewählt, da sie im Tau-Aggregationsassay bereits potente Daten lieferte und zudem mit dem fluoreszenten Baustein Coumarin ausgestattet ist. Die Aktivitätsdaten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Thiazin Red ist ein Fluorophor mit hoher Affinität zu fibrillärem Tau.<sup>[282]</sup> Für unsere Studien wurde die verwandte Verbindung **158** (BSc3119, Abb. 63) synthetisiert, die mit eine Azagruppe und einem Chinolingrundgerüst ausgestattet ist und damit ebenfalls fluoreszierende Eigenschaften aufweist.



**Abb. 63:** fluoreszierende PHF-Binder

Die Verbindung **158** wurde ausgehend von 4-Nitrobenzoylchlorid (**159**) und 2-Aminobenzthiol (**160**) hergestellt (Abb. 64). Die beiden Edukte lieferten 2-(4-Nitrophenyl)-benz(*d*)thiazol (**161**) in 95% Ausbeute, das mit Zinnchlorid zu 4-(Benz(*d*)thiazol-2-yl)anilin (**162**) reduziert wird. 4-(Benz(*d*)thiazol-2-yl)anilin wird schließlich diazotiert und mit 8-Hydroxychinolin (**163**) umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Methanol wird das Chinolinol **158** in 95% Ausbeute erhalten.

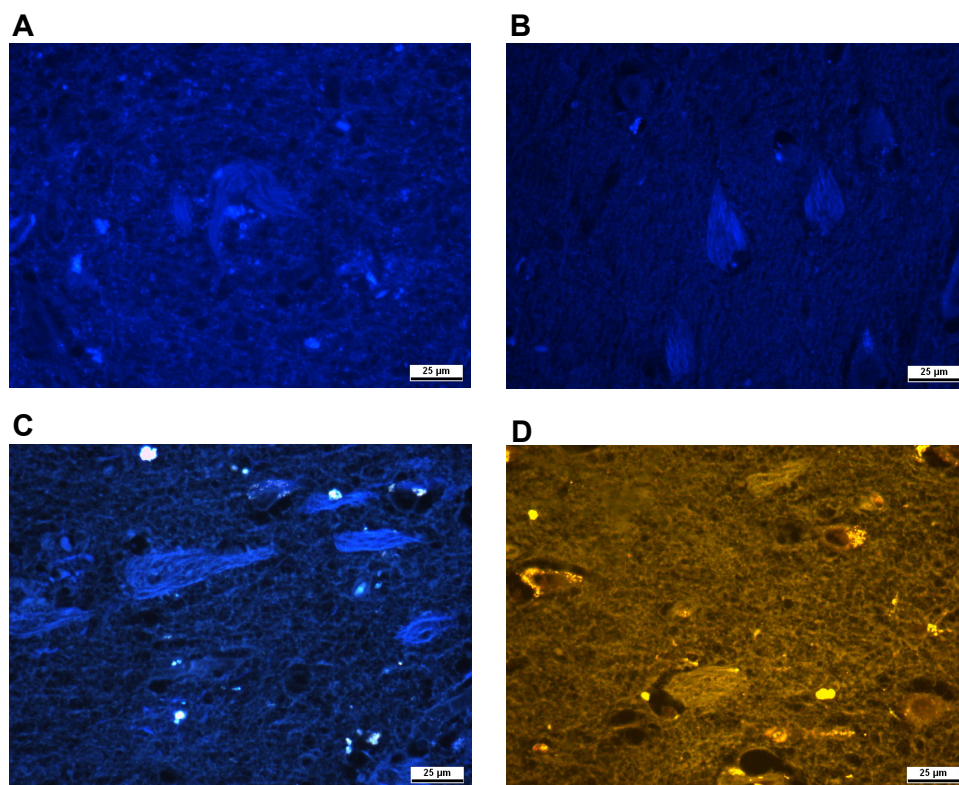
Abb. 64: Synthese der Verbindung **158**

Die Verbindungen **158** wurde ebenfalls auf die Tau-Aggregation und PHF-Depolymerisation in einem zellfreien Assay untersucht<sup>[216, 219]</sup> und zeigt eine sehr potente Hemmung im nanomolaren Bereich (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: IC<sub>50</sub> und DC<sub>50</sub> Werte der Verbindungen **156** und **157**

Verbindung	BSc Nummer	Tau $\mu\text{M}$		Fluoreszenz nm	clogP	tPSA
		IC <sub>50</sub>	DC <sub>50</sub>			
<b>157</b>	2993	23.2	11.1	500	1.2	92
<b>158</b>	3119	0.28	0.36	366	6.4	69

Zur histologischen Untersuchung wurden Gewebeproben aus dem Ammonshorn (Hippocampus) eines Alzheimer-Patienten mit den Verbindung **157** und **158** gefärbt. Dazu wurde das Färbeprotokoll für die sonst übliche Thioflavin-Färbung verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass beide Verbindungen intensiv die intrazellulären Tangles anfärben; die extrazellulären Plaques sind nur schwach gefärbt. (Abb. 65). Die schlechte Löslichkeit der Verbindung **157** erschwert allerdings die Auswertung, da ein Auskristallisieren auf der Schnittoberfläche nicht verhindert werden konnte. Die Färbung mit Verbindung **158** ist sehr kontrastreich und verläuft ohne Löslichkeitsprobleme.



**Abb. 65:** histochemische Färbung von Gehirnschnitten aus dem Ammonshorn (Hippocampus) von Alzheimer-Patienten aufgenommen mit einem Fluoreszenzmikroskop. (A) und (B): mit Verbindung **158** angefärbte Tangles; (C) und (D) mit **157** angefärbte Tangles, bei D wurde ein DAPI Filter verwendet, bei A, B und C ein Blaufilter.

Die durchgeführten Studien zeigen, dass zwischen einem niedrigen IC<sub>50</sub>- und DC<sub>50</sub>-Wert und der Färbung der Tau-Tangles eine gute Relation besteht. Thioflavin färbt sowohl die Plaques und Tangles relativ unspezifisch; mit den Verbindungen **157** und **158** konnte eine deutliche Selektivitätssteigerung bezüglich der Tangles erreicht werden. Die Löslichkeitsprobleme bei der Färbung mit **157** konnten trotz einer Optimierung des Färbeprotokolls nicht behoben werden, daher richten sich zukünftige Studien auf eine weitere Selektivitätssteigerung der Verbindung **158** durch Derivatisierung.



### 3.8 Potential von GSK3-Inhibitoren in der Alzheimer Therapie

#### 3.8.1 Arbeitshypothese

Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) ist stark an der synaptischen Plastizität und damit an der Bildung, Versorgung und Verstärkung der Synapsen beteiligt. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten führen geirnspezifische Ablagerungen von intra- oder extrazellulären Amyloid-Aggregaten zu einer erhöhten GSK3-Aktivität. Die zugrunde liegenden molekularbiologischen Prozesse sind bisher nicht bekannt. Die erhöhte GSK3-Aktivität in den Gehirnregionen führt zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und damit zur Ablösung des Proteins von den Mikrotubuli. Diese Prozesse verhindern die Prozesse an den Synapsen und damit die Reizweiterleitung – die wichtigste Voraussetzung für Gedächtnis und Lernprozesse. Auch weitere GSK3-Substrate wie z.B.  $\beta$ -Catenin werden phosphoryliert und in ihren Funktionen gehemmt. Die Phosphorylierung von APP an T668 beschleunigt die amyloidogene Prozessierung. GSK3 ist damit essentiell bei der Entwicklung der Tauopathie und der Zerstörung der Synapsen bei der AD beteiligt.

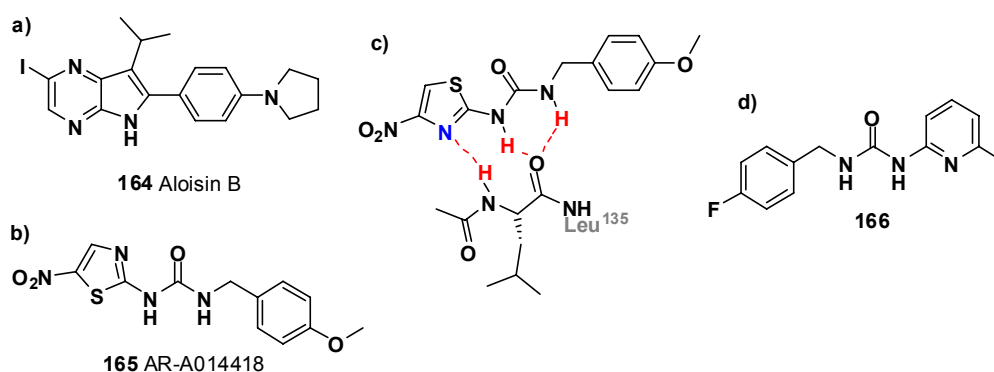
2003 wurde gezeigt, dass Lithium neben der Hemmung der Tau-Phosphorylierung die Produktion von A $\beta$  reduziert.<sup>[283]</sup> Die Inhibition von GSK3 verhindert demnach beide pathologischen Prozesse von AD. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt allerdings, dass nicht-toxische Konzentrationen von Lithium in zwei verschiedenen *in vitro* Testsystemen die A $\beta$ -Produktion dagegen über eine Aktivierung der  $\beta$ -Sekretase erhöhen.<sup>[284]</sup> Eine Verwendung von Lithium als Alzheimer-Therapeutikum scheint somit ausgeschlossen.

Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse bleibt die Inhibition von GSK3 weiterhin eine viel versprechende Möglichkeit, die pathogenen Prozesse der AD zu verhindern. Untersuchungen von GSK3-Inhibitoren sollen neue Erkenntnisse über das Potential in der Alzheimertherapie liefern.

#### 3.8.2 Design neuer GSK3-Inhibitoren

Publizierte Röntgenstrukturanalysen von GSK3-Inhibitorkomplexen erleichtern das rationale Design neuer Hemmstoffe.<sup>[285, 286]</sup> Zahlreiche Verbindungen konnten bislang als potente GSK3-Inhibitoren identifiziert werden.<sup>[287]</sup> Viele dieser Substanzen, darunter Aloisin B (**164**, s. Abb. 66a), besitzen eine hohe Aktivität, wirken allerdings gegenüber GSK3-strukturverwandten Enzymen genauso als Antagonisten. Für Substanz AR-A014418 (**165**), die von AstraZeneca entwickelt wurde, scheint dies nicht zu gelten. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindung zwar GSK3 im nanomolaren Bereich inhibiert, allerdings

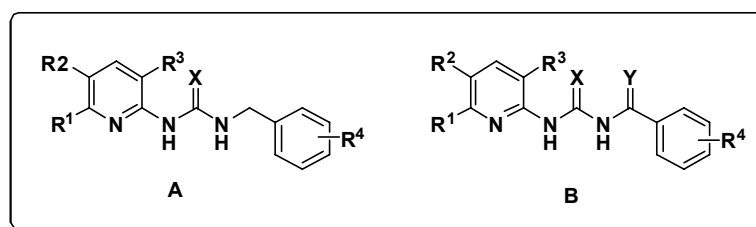
keinerlei Einfluss auf die Aktivität anderer Kinasen ausübt.<sup>[288]</sup> Neben der hohen Aktivität trägt gerade diese Eigenschaft dazu bei, dass das Grundgerüst von Substanz **165** besonders geeignet erscheint, um das Potential von GSK3-Inhibitoren für die Alzheimertherapie weiter zu untersuchen. AR-A014418 inhibiert die Phosphorylierung von Tau an den GSK3-spezifischen Stellen und verhindert somit den Funktionsverlust der Nervenzellen. Dieser Inhibitor stellt einen potentiellen Wirkstoff für die therapeutische Behandlung der Alzheimer-Demenz dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von diesen Erkenntnissen potente und selektive GSK3-Inhibitoren auf der Grundlage der Strukturen vom ATP-kompetitivem Inhibitor AR-A014418 ( $IC_{50} = 104 \pm 27$  nM) zu entwickeln (s. Abb. 66). AR-A014418 bildet drei Wasserstoff-brückenbindungen zu den Hauptkettenatomen von GSK3 $\beta$  (s. Abb. 66c). Die Nitrogruppe des Inhibitors interagiert mit der hydrophilen Innenseite der Bindungstasche und der Phenylring ermöglicht eine optimale Interaktion mit dem Enzym. Ein Nachteil von **165** ist allerdings, dass aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit das Passieren der Blut-Hirn-Schranke nicht gewährleistet ist (tPSA = 105.3).



**Abb. 66:** GSK3-Inhibitoren a) Aloisin B (**164**) und b) AR-A014418 (**165**) ; c) Substrat-Enzym-Interaktion durch drei Wasserstoffbrückenbindungen; d) Verbindung **166**

In einer früheren Arbeit von Lars Weyrauch im Arbeitskreis Schmidt wurden zahlreiche Harnstoffderivate mit verschiedenen heteroaromatischen Resten durch Kupplung von Isocyanaten mit verschiedenen Aminen hergestellt und auf ihre Aktivität bezüglich der GSK3-Inhibition untersucht.<sup>[259]</sup> Das Thiazol von AR-A014418 wurde durch verschiedene heteroaromatische Reste wie Isoxazol, Benzthiazol, Isothiazol, Pyridin und Pyrazolopyridin ausgetauscht. Am aktivsten war Verbindung **166** (s. Abb. 66d), die einen Pyridinring trägt und die Tau-Phosphorylierung in einem N2a-Tau4R-EGFP-Zellassay bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M um etwa 60% hemmt. Keine der synthetisierten Verbindungen ist in der Lage, die A $\beta$ -Bildung zu verringern und gleichzeitig die Tau-Phosphorylierung zu unterdrücken.

Beim Design neuer Inhibitoren ist die Möglichkeit zur Ausbildung der drei Wasserstoffbrückenbindungen Voraussetzung. Außerdem sollte der neue Inhibitor vergleichbare Winkel wie AR-A014418 aufweisen und somit optimal in die Bindungstasche passen. Da die Verbindung **166** bereits eine gute Aktivität erzielte, sollte durch Variation der Grundstruktur eine weitere Aktivitätssteigerung möglich sein. Die Grundstruktur stellt zudem ein einfach zugängliches System dar und durch die Veränderung von funktionellen Gruppen ist eine Vielfalt an Derivaten von Harnstoffen und Thioharnstoffen (s. Abb. 67, **A**) zugänglich. Um in der Aktivitätsbestimmung herauszufinden, ob der Tetraederwinkel der Methylen-Gruppe einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität hat, sollten Derivate mit einem  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoff hergestellt werden (s. Abb. 67, **B**).



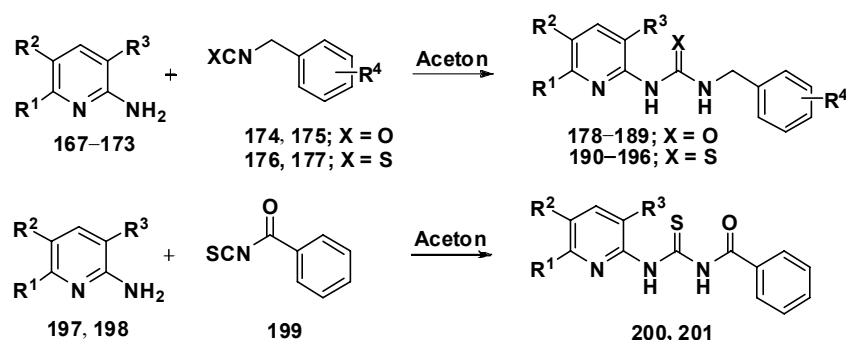
**Abb. 67:** Allgemeine Grundstrukturen **A** und **B** als mögliche GSK3-Inhibitoren

### 3.8.3 Synthese von potentiellen GSK3-Inhibitoren

Die Grundstrukturen von **A** und **B** enthalten ein Pyridinylharnstoffmotif (Abb. 7.1), welches ausgehend von substituierten Aminopyridinen und Benzylisocyanaten, Benzylisothiocyanaten bzw. Benzoylisocyanaten hergestellt werden kann (Abb. 68). Durch Variation der Reste  $R^{1-4}$  können auf einfache Weise verschiedene Derivate des Strukturtyps hergestellt werden, deren Einfluss auf die A $\beta$ -Bildung und die Tau-Aggregation untersucht werden können.

Die Pyridinylharnstoffe **179–189** konnten in einem multiparallelen Syntheseansatz hergestellt werden (s. Abb. 69, Tabelle 11). Dazu wurden die Benzylisocyanatderivate **174** und **175** in trockenem Aceton für ca. 24 h unter Rückfluss mit den Aminopyridinen **167–173** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde abfiltriert und mit wenig Aceton gewaschen. Das Filtrat wird anschließend auf Eis gegeben, der Feststoff wird abfiltriert und mit kaltem Wasser und Hexan gewaschen. Zur Aufreinigung wird das Rohprodukt aus einem Ethylacetat–Hexan-Gemisch (1:1) umkristallisiert, so dass die Substanzen **178–189** in 5–96% Ausbeuten erhalten werden

konnten (Tabelle 11). Die Variation der Ausbeute ist durch die aktivierende oder desaktivierende Wirkung der Pyridinsubstituenten zu erklären.



**Abb. 68:** Synthese der Pyridinylharnstoffe **179–189**, -thioharnstoffe **190–196** und Derivate **200, 201**

**Tabelle 11:** Ausbeute, clogP und tPSA-Werte der hergestellten Pyridinylharnstoffe **179–189**, -thioharnstoffe **190–196** und Derivate **200, 201**

Verbindung	BSc Nummer	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Ausbeute in %	clogP	tPSA
<b>178</b>	3800	H	I	H	H	38	3,60	53,49
<b>179</b>	3816	H	NO <sub>2</sub>	H	H	61	2,37	105,3
<b>180</b>	3817	H	Br	H	H	60	3,34	53,49
<b>181</b>	3818	H	CN	H	H	5	2,08	77,28
<b>182</b>	3819	H	H	H	H	76	2,34	53,49
<b>183</b>	3820	Me	H	H	H	82	2,84	53,49
<b>184</b>	3821	H	CF <sub>3</sub>	Cl	H	26	3,66	53,49
<b>185</b>	3856	H	I	H	OMe	13	3,52	62,70
<b>186</b>	3857	H	NO <sub>2</sub>	H	OMe	27	2,29	114,50
<b>187</b>	3858	H	Br	H	OMe	70	3,26	62,70
<b>188</b>	3826	H	H	H	OMe	40	2,26	62,72
<b>189</b>	3827	Me	H	H	OMe	96	2,76	62,72
<b>190</b>	3855	H	I	H	H	10	3,38	36,20
<b>191</b>	3822	H	Br	H	H	7	3,12	36,42
<b>192</b>	3823	H	H	H	H	29	2,12	36,42
<b>193</b>	3824	Me	H	H	H	45	2,62	36,42
<b>194</b>	3860	H	I	H	OMe	2	3,30	45,60
<b>195</b>	3859	H	Br	H	OMe	2	3,04	45,60
<b>196</b>	3825	Me	H	Cl	OMe	44	2,54	45,65
<b>200</b>	3798	-	I	-	-	77	3,29	53,49
<b>201</b>	3799	-	NO <sub>2</sub>	-	-	44	2,06	105,30

Die Synthese der Pyridinylthioharnstoffe **190–196** (Abb. 68) erfolgte durch Umsetzung von sieben Aminopyridinen (**167–173**) mit den beiden Benzylisothiocyanaten **176** und **177**. Die

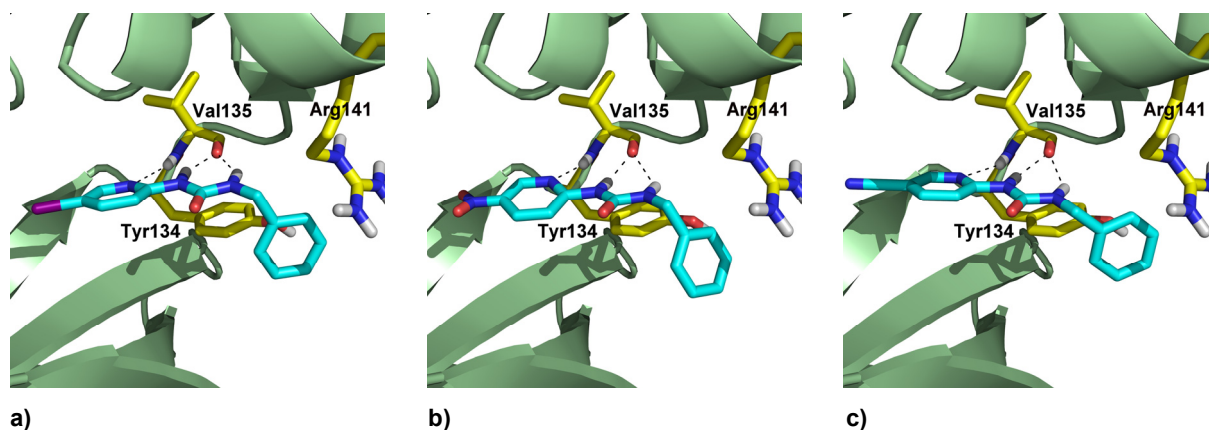
Ausbeute liegt dabei zwischen 2–45%. Die beiden Derivate **200** und **201** konnten durch die Umsetzung der Aminopyridine **197** und **198** mit dem Benzoylisothiocyanat **199** in 77% und 44% Ausbeute hergestellt werden. Die Reaktion mit den Isothiocyanaten führte demnach insgesamt zu schlechteren Ergebnissen als die Reaktion mit den Isocyanaten, was sich durch die unterschiedliche Reaktivität begründen lässt.

### 3.8.4 Biologische Ergebnisse

Die Betrachtung der berechneten clogP-Werte, der Anzahl der Wasserstoffdonatoren und -akzeptoren sowie der molaren Masse zeigt, dass die Pyridinylharnstoffe **178–189** günstige physikochemische Eigenschaften aufweisen. Allerdings deutet der tPSA-Wert darauf hin, dass nicht jede Substanz die Blut-Hirn-Schranke durchdringen wird. Besonders auffällig sind die Verbindungen **179**, **181** und **186**, deren tPSA-Wert deutlich über 60 liegen (Tabelle 11). Bei Substanzen mit Nitro- oder Cyano-Gruppe ist die Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke demnach erschwert.

Fast alle Pyridinylthioharnstoffe (**190–196**) weisen nach der Lipinski-Regel gute physikochemische Eigenschaften auf. Dies zeigen der clogP-Wert, der tPSA-Wert und die Anzahl der Wasserstoffdonatoren und -akzeptoren. Auch die molare Masse aller Verbindungen ist <500 g/mol. Die Verbindung **201** besitzt ebenfalls einen tPSA-Wert deutlich über 60, was darauf hindeutet, dass die Substanz die Blut-Hirn-Schranke vermutlich nicht durchdringen wird. Wiederum zeigt sich, dass besonders die Nitro-Gruppe eine negative Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit hat.

Die Verbindungen **178–196**, **200** und **201** wurden unter Verwendung des Programms AutoDock *in silico* Studien unterzogen (L. Marinelli, V. Limongelli, Neapel). Diese Studien zeigen, dass die Grundgerüste **A** und **B** (s. Abb. 67) in die Substratbindungstasche von GSK3 passen. Dabei wurden drei Wasserstoffbrückenbindungen mit Val135 sowie Wechselwirkungen mit dem Benzolring von Tyr134 sowie mit der Seitenkette von Arg141 berechnet (s. Abb. 69). Weiterhin sagen die berechneten Bindungsmodi der Verbindung voraus, dass der *para*-Substituent des Benzolrings (z.B. Iod, Nitro- oder Cyanogruppe) mit einem oder mehreren in der polaren Region der Bindungstasche (bestehend aus Asp, Glu und Lys) lokalisierten Wassermolekül(en) interagieren könnten.

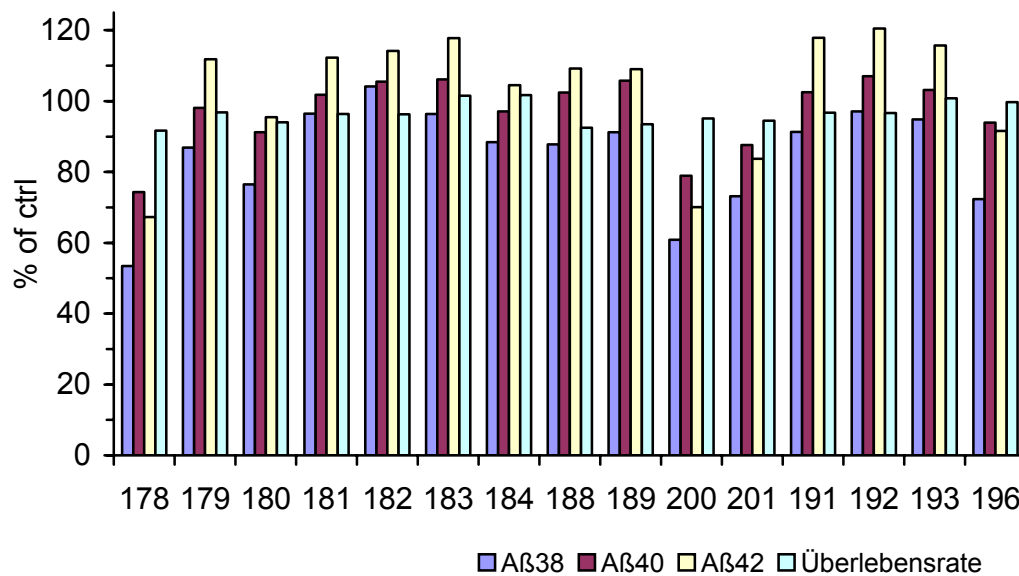


**Abb. 69:** „Docking“ der Verbindungen in die aktive Tasche von GSK3. Zur Verfügung gestellt von Luciana Marinelli, Software: AutoDock. a) **178** (BSc3800), b) **179** (BSc3816) und c) **181** (BSc3818)

Um das Potential der synthetisierten Verbindungen **178–196**, **200** und **201** für die Alzheimertherapie beurteilen zu können, wurden sie auf ihre Eigenschaften untersucht, die A $\beta$ -Bildung zu hemmen und die Tau-Phosphorylierung zu verhindern. Die Aktivitätsbestimmungen wurden von Dr. Karlheinz Baumann, Roche Basel, und Prof. Fred van Leuven, Flanders Interuniversity for Biotechnology in Leuven, Belgien, durchgeführt.

#### 3.8.4.1 Einfluss auf die A $\beta$ -Aktivität

Um die Wirkung der Verbindungen **178–196**, **200** und **201** auf die A $\beta$ -Aktivität festzustellen, werden sie im A $\beta$ -LPECL-Assay (s. Kap. 3.2.4) untersucht. Die Abbildung 70 zeigt, dass keine der getesteten 20  $\mu\text{mol/l}$ -Lösungen der Verbindungen eine deutliche Hemmwirkung auf die  $\gamma$ -Sekretase aufweist. Verbindung **182** zeigt eine Steigerung der A $\beta_{38}$ -Konzentration. Bei allen anderen getesteten Substanzen geht die A $\beta_{38}$ -Konzentration leicht zurück. Die Menge an A $\beta_{40}$  sinkt bei den Verbindungen **178–180**, **184**, **196**, **200** und **201** in geringem Maße. Bei den Substanzen **181–183**, **188**, **189** und **191–193** steigt die A $\beta_{40}$ -Menge sogar an. Die Verbindungen **178**, **180**, **196**, **200** und **201** zeigen eine geringe Verminderung der A $\beta_{42}$ -Konzentration. Bei den restlichen Substanzen steigt die Menge der A $\beta_{42}$ . Die Werte für die Überlebensrate liegen bei allen Verbindungen über 90%. Auch die getesteten 5  $\mu\text{mol/l}$ -Lösungen der Verbindungen haben ebenfalls keine Wirkung auf die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität (Ergebnisse nicht abgebildet).



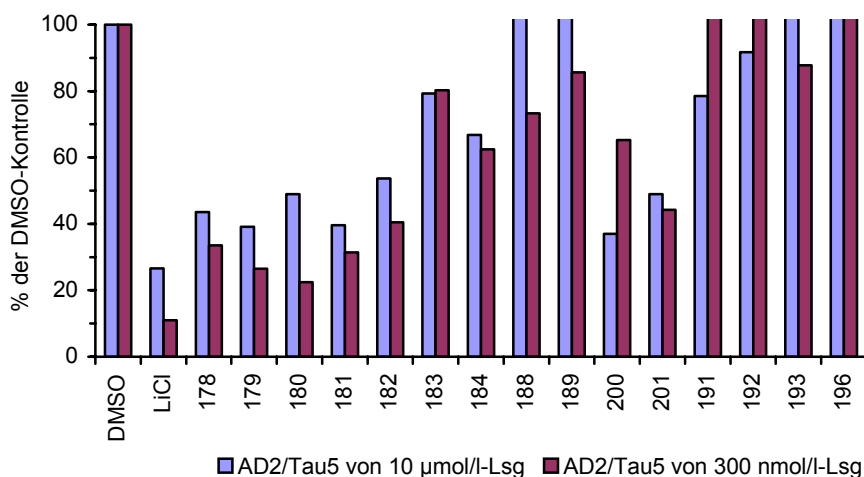
**Abb. 70:** Aβ-Mengen und Überlebensraten nach Zugabe von 20 µmol/l-Lösungen der getesteten Substanzen

### 3.8.4.2 Einfluss auf die Tau-Phosphorylierung

Der Einfluss auf die Phosphorylierung von Tau wird an N2a-Tau4R-EGFP-Neuroplasten sowie SH-SY5Y-Zellen untersucht. Dieses sind junge, nicht endgültig differenzierte Nervenzellen, die sich teilen bzw. Funktionsproteine synthetisieren. Der Einfluss der Verbindungen **178–196**, **200** und **201** auf die Phosphorylierung von Tau wurde bei zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (10 µM, 300 nM) bestimmt. Die Aktivität wird als Quotient von AD2 und Tau-Gesamtgehalt identifiziert. Eine Senkung der Enzymaktivität zeigt sich in der Abnahme der Phosphoepitope. AD2 gibt die Gesamtmenge an Tau-Protein an, Tau5 steht für ein Phosphoepitop, das durch Phosphorylierung der Serine 396 und 404 durch GSK3 gebildet wird. Anhand von Western-Blots wird das Epitop und der Gehalt an Gesamt-Tau identifiziert. Als Positivkontrolle des Neuroplasten-Assays dient eine Lithiumchloridlösung, als Negativkontrolle eine DMSO-Lösung. Je kleiner der Quotient von AD2 zu Tau5 ist, desto besser wird die Phosphorylierung durch die getestete Substanz unterbunden.

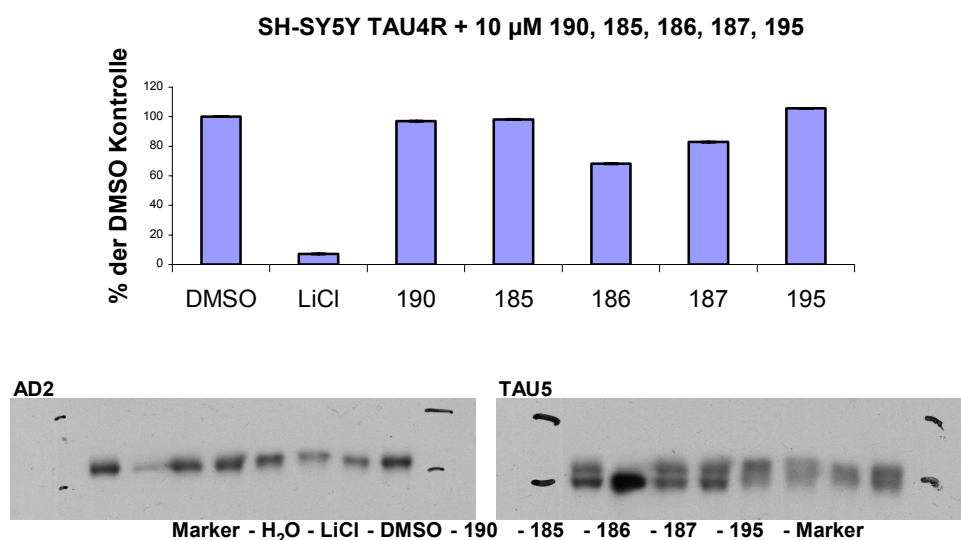
Anhand der Abbildung 71 ist zu erkennen, dass einige der Substanzen einen hemmenden Effekt auf die Tau-Phosphorylierung aufweisen. Bei den 10 µmol/l-Lösungen zeigt die Substanz **200** im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit 37% die stärkste Hemmung der Tau-Phosphorylierung. In einem ähnlichen Bereich liegen die Verbindungen **179** und **181**, darauf

folgen **178**, **180**, **183** und **201** mit den Werten 44%, 49%, 54% und 49%. Die Substanzen **183**, **184**, **188**, **191–193** und **196** zeigen eine Aktivität im Bereich von 67–194%. Verbindung **189** hat keine Hemmwirkung auf die Tau-Phosphorylierung. Bei den 300 nmol/l-Lösungen zeigt die Verbindung **180** mit 22% die stärkste Hemmung der Phosphorylierung, gefolgt von **179** mit 27%. Die Verbindungen **178**, **180**, **182** und **201** liegen im Bereich von 31–44%. Die Substanzen **184**, **188**, **189**, **200**, **191–193** und **196** zeigen mit ihren Aktivitäten von 62–120% eine mäßige bis keine Inhibition von GSK3.



**Abb. 71:** Quotient von AD2 zu Tau5 nach Zugabe von 10 µmol/l- und 300 nmol/l-Lösungen der Substanzen

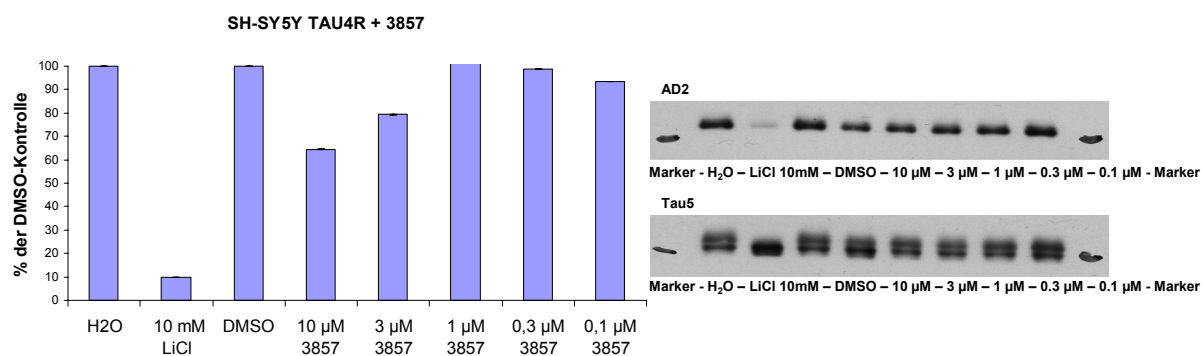
Die Aktivität der Verbindungen **185–187** und **190** und **195** wurde in SH-SY5Y-Zellen untersucht und ist in Abb. 72 dargestellt. Die stärkste Hemmwirkung mit einem Wert von 68% und 82% weisen die Verbindung **186** und **187** auf. Auch die Western-Blots zeigen für diese beiden Verbindungen die stärkste Hemmwirkung (Abb. 72).



**Abb. 72:** Oben: Quotient von AD2 zu Tau5 nach Zugabe von 10 µmol/l-Lösungen Substanzen **185–187**, **190**, **195**; Unten: Western-Blots von AD2 und Tau5 von 10 µmol/l-Lösungen der getesteten Substanzen



Aufgrund ihrer starken Hemmwirkung wurde die Verbindung **186** (BSc3857) auf ihre dosisabhängige Wirkung untersucht. Abb. 73 zeigt die Hemmwirkung bei 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$ . Dabei wird ersichtlich, dass die Hemmung konzentrationsabhängig ist. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ist keine Hemmwirkung mehr zu beobachten.



**Abb. 73:** links: Quotient von AD2 zu Tau5 nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentration von **187** (BSc3857); rechts: Western-Blots von AD2 und Tau5 von unterschiedlichen Konzentration der Substanz **187**

### 3.8.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Synthese der Pyridinylharnstoffe und -thioharnstoffe **178–196**, **200** und **201** gelang in moderaten bis sehr guten Ausbeuten. Die unkatalysierte Addition zu den Pyridinylharnstoffen verlief in besseren Ausbeuten als die Reaktion zu den Thioharnstoffen. Prinzipiell gestaltete sich die Synthese mit elektronenziehenden Substituenten am Pyridinderivat problematisch.

Die Verbindungen wurden bezüglich ihrer Wirkung auf die Hyperphosphorylierung von Tau und auf die APP-Spaltung zu  $\text{A}\beta_{38}$ ,  $\text{A}\beta_{40}$  und  $\text{A}\beta_{42}$  untersucht. Hierbei zeigte sich, dass keine der Verbindungen eine signifikant inhibierende oder modulierende Wirkung auf die  $\gamma$ -Sekretase aufweist. Außerdem zeigt keine der Verbindungen eine signifikante Zelltoxizität. Bei der Untersuchung auf Tau-Phosphorylierung konnten einige Hemmstoffe identifiziert werden, die nun für eine weitere *in vivo* Validierung bereit stehen. Besonders herausragend ist die Aktivität der drei Harnstoffe **179–181** mit deaktivierenden (-CN, -NO<sub>2</sub> und -Br) Substituenten. Somit scheint ein elektronenziehender Substituent am Pyridinring entscheidend für eine starke Wechselwirkung mit GSK3 zu sein. Die weniger aktiven Harnstoffderivate tragen schwach aktivierende oder keine Substituenten. Die Thioharnstoffe weisen generell eine deutlich schlechtere Aktivität auf. Da sie außerdem im Verdacht stehen, lebertoxisch zu sein, stellen sie keine geeigneten Wirkstoffkandidaten dar. Die Aktivität der Benzoylderivate **200** und **201** liegt im mittleren Aktivitätsbereich. Aufgrund ihrer leichten Hydrolysefähigkeit

ist eine weitere *in vivo*-Untersuchung jedoch auszuschließen. Die Hemmung der Tau-Phosphorylierung durch Lithiumchlorid lässt sich durch einen nicht GSK3-kompetitiven Mechanismus erklären. Bei den getesteten Substanzen ist allerdings eine APP-kompetitive Hemmung zu erwarten, was sich durch die Ähnlichkeit der Strukturen zu AR-A014418 begründen lässt.

Eine Weiterentwicklung ähnlicher Strukturen mit elektronenziehenden Substituenten wäre somit sinnvoll. Weiterhin wäre zu klären, ob der Pyridinring einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität hat. Die Synthese vergleichbarer, einfach zugänglicher Heteroaromaten (A; Abb. 74) würde hierbei Aufschluss geben.

Die ebenfalls durch strukturbasiertes Wirkstoffdesign ermittelten in Abb. 74 dargestellten Grundgerüste **B** und **C** wären ebenfalls interessant, da sie die metabolische Instabilität des Harnstoffmotifs von **A** umgehen. Die Einführung von sterisch anspruchsvollen Substituenten könnte eine Selektivität gegenüber anderen Kinasen gewährleisten. Metabolisch instabile Funktionalitäten sollen dabei ersetzt werden. Weitere Derivatisierungen könnten zu einer erhöhten Aktivität, Löslichkeit, besseren Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke und einer oralen Verfügbarkeit führen. Die weitere Untersuchung dieser Substanzen erfolgt im Rahmen des EU Projekts EEC/FP7/NEURO.GSK3.

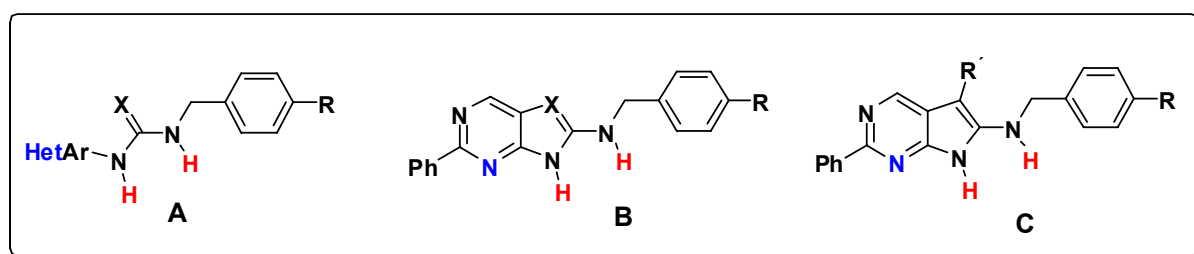


Abb. 74: potentielle GSK3-Inhibitoren

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte eine Anzahl von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und Modulatoren, Aggregationinhibitoren und GSK3-Inhibitoren synthetisiert werden. Zu diesem Zweck wurde auf bekannte Synthesemethoden zurückgegriffen oder es wurden bestehende Synthesen modifiziert und untersucht. Die Synthesen beruhen auf Transformationen von Thiazolylaminen und -amiden, Fenofibrat, Tetracyclin, Pyridinylharnstoffen und -thioharnstoffen.

***$\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren:*** Zur Synthese von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren konnten verschiedene Thiazolylamine und -amide erfolgreich hergestellt werden. Zudem wurde eine Syntheseroute für neue Thiazolylharnstoffe entwickelt. Einige dieser semi-peptidischen und nicht-peptischen Verbindungen sind in der Lage, die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase im unteren mikromolaren Bereich zu hemmen.

Mit der Synthese von Fenofibrat-abgeleiteten Strukturen gelang es, die inverse zur normalen Modulation umzukehren. Die Einführung der lipophilen Reste wie Alkylketten oder Aromaten beeinflusst die Spaltung von A $\beta$ ; die Verbindungen reduzieren die Bildung von A $\beta$ <sub>42</sub> und erhöhen die A $\beta$ <sub>38</sub>-Konzentrationen. Fenofibratdimere mit kürzeren Alkylketten (C-7, C-6, C-5, usw.) könnten zu einer Aktivitätssteigerung führen und Bindungsstudien herangezogen werden. Die Synthesewege hierzu sind hinreichend bekannt.

In Studien zur Identifizierung der  $\gamma$ -Sekretase-Bindungsstelle gelang es einen photosensitiven Diazirinbaustein zu entwickeln, der sich in aktive Inhibitoren einbauen und in Markierungsexperimenten untersuchen lässt.

***Aggregationsinhibitoren:*** Mittels eines neu entwickelten Modellassays wurden Verbindungen mit anti-amyloidogener Wirkung identifiziert. Zahlreiche Verbindungen beeinflussen dabei die beiden Hauptprozesse der AD-Pathologie: die A $\beta$ - und Tangle-Produktion sowie die Polymerisation. Die untersuchten Verbindungen hemmen in mikromolaren Konzentrationen die A $\beta$ -Sekretion sowie die Fibrillenbildung von Hexapeptidsequenzen und fibrillärem A $\beta$ <sub>42</sub>. Zudem sind die Verbindungen in der Lage, die A $\beta$ <sub>42</sub>-induzierte Toxizität in Zellkulturen zu vermindern. Ausgewählte Verbindungen nehmen weiterhin Einfluss auf die Tau-Aggregation und bewirken die Depolymerisation bei niedrigen Konzentrationen. Der Hemmmechanismus dieser multipotenten Aggregationsinhibitoren scheint von der Aminosäuresequenz des beteiligten Peptids oder Proteins unabhängig zu sein; der genau vorliegende Ablauf ist jedoch nicht geklärt. Die untersuchten Tetracyclin-Derivate

binden an extrazelluläre Plaques sowie an intrazelluläre Tangles und sind aufgrund ihrer Fluoreszenzfähigkeit zum Einsatz in der histologischen Untersuchung von Alzheimer-Gehirnschnitten geeignet. Die Verbindung **154** sowie ein Chinolinderivat weisen dabei eine höhere Affinität zu den Tangles auf und liefern ein sehr kontrastreiches Färbeergebnis.

**GSK3-Inhibitoren:** Die Synthese der Pyridinylharnstoffe und -thioharnstoffe gelang in moderaten bis sehr guten Ausbeuten. Die hergestellten Verbindungen wurden auf ihre Wirkung auf die Tau-Phosphorylierung untersucht und einige potente Hemmstoffe wurden identifiziert. Besonders herausragend ist die Aktivität der drei Harnstoffe mit desaktivierenden (-CN, -NO<sub>2</sub> und -Br) Substituenten. Somit scheint ein elektronenziehender Substituent am Pyridinring entscheidend für eine starke Wechselwirkung mit GSK3 zu sein. Die Thioharnstoffe weisen generell eine deutlich schlechtere Aktivität auf. Eine Weiterentwicklung ähnlicher Strukturen mit elektronenziehenden und sterisch anspruchsvollen Substituenten könnte zu einer Aktivitätssteigerung und Selektivität gegenüber anderen Kinasen führen.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeine Anmerkungen

*Lösungsmittel:* Die für den Einsatz in wasserempfindlichen Reaktionen verwendeten Lösungsmittel THF, DMSO, Toluol und DMF wurden bei der Firma Fluka gekauft, entsprechender Diethylether stammt von der Firma Roth.

*Edukte und Reagenzien* wurden bei Fluka, Riedel-de Haën, Aldrich, Alfa Aesar, Lancaster, Sigma, Acros Organics, Fluorochem, Bachem oder Lancaster gekauft und direkt eingesetzt. Die Hexapeptide wurden bei Thermo peptides gekauft.

*Dünnschichtchromatographie:* Zur Dünnschichtchromatographie dienten DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F254 der Firma Merck. Die Entwicklung der DC-Platten wurde neben der Detektion der Fluoreszenzlöschung ( $\lambda = 254$  nm und  $\lambda = 366$  nm) durch Anfärben mit einer der folgenden Lösungen durchgeführt: Ninhydrin-Lösung (0.5 g Ninhydrin, 100 mL Isopropanol, 5 mL Eisessig), Vanillin-Lösung (0.3 g Vanillin, 30 mL Wasser, 4 mL konz. Schwefelsäure, 25 mL Ethanol).

*Säulenchromatographie:* Als stationäre Phase für die Flash-Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (15–40  $\mu$ m und 40–63  $\mu$ m) der Firma Merck verwendet. Die Trennungen wurden bei r.t. durchgeführt.

*Kernresonanz-Spektroskopie:* Die NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern ARX 300 und DRX 500 der Firma Bruker Biospin GmbH aufgenommen. Die jeweilige Messfrequenz und das verwendete Lösungsmittel sind den spektroskopischen Daten in Klammern vorangestellt. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm tieffeldverschoben zu Tetramethylsilan als interner Standard ( $\delta = 0$  ppm) angegeben. Zur Bezeichnung der Feinstrukturen der Protonen-Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett). Die Kopplungskonstanten  $J$  werden in Hertz angegeben.

*Massenspektroskopie:* ESI-MS-Spektren wurden mit einem Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer und EI-MS-Spektren mit einem doppelt fokussierenden Massenspektrometer MAT 95 aufgenommen. Die detektierten Ionenmassen  $m/z$  werden in u angegeben.

*Schmelzpunkte:* Die Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktbestimmungs-Apparatur FP51 der Firma Mettler in offenen Glaskapillaren bestimmt und sind unkorrigiert.

*Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie:* HPLC-Messungen erfolgten an einem Agilent 1100 (Säule: reversed phase, Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 mm; Wellenlängendetektion bei 254 nm). Als Laufmittel wurden Wasser und MeCN in verschiedenen Gradientenmischungen verwendet: (a) Methode 1: von 30% (0 bis 1 min) auf 90% MeCN (ab 10 min), (b) Methode 2: von 30% (0 bis 1 min) auf 90% MeCN (ab 6 min), (c) Methode 3: von 50% (0 bis 1 min) auf 90% MeCN (0 bis 10 min), (d) Methode 4: von 50% MeCN (0 bis 1 min) auf 90% MeCN (ab 10 min) (e) Methode 5: von 30% (0 bis 1 min) auf 100% MeCN (ab 12 min).

*Mikrowelle:* Bei dem Mikrowellengerät handelt es sich um das Modell Initiator (300 W) der Firma Biotage.

*Transmissionselektronenmikroskop:* Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde an einem FEI Morgagni 268D durchgeführt. Die verwendeten EM-Grids stammen von Plano.

*Ultraviolett-spektroskopie:* Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer UV-2401 der Firma Shimadzu.

*Fluoreszenzspektroskopie:* Alle Fluoreszenzmessungen erfolgten an dem Spektrometer RF-1501 der Firma Shimadzu.

## 5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Im Folgenden werden allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) häufig verwendeter Reaktionen erläutert. Die hier angegebenen Mengen entsprechen den eingesetzten Verhältnissen und liegen im Maßstab der durchgeführten Reaktionen. Abweichungen in den Mengenangaben, den Reaktionsbedingungen oder der Aufarbeitung sind unter der detaillierten Synthesebeschreibung in Kap. 5.3 angegeben.

### AAV1: Amidkupplung mit HATU/HOBt

Zum Z-geschützten Dipeptid (1.00 mmol) wird DMF (2 mL) gegeben. Unter Argonatmosphäre und Kühlung auf 0 °C erfolgt die Zugabe von HOBt (1.05 mmol) und HATU (1.00 mmol). Nach 15 min erfolgt die Zugabe des Amins (0.50 mmol) sowie Collidin (2.00 mmol). Es wird weitere 12 h bei r.t. gerührt. Zur Reaktionsmischung wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) gegeben und mit Salzsäure (0.1 N, 3x 20 mL), NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (halbges., 3x 20 mL) und dest. Wasser (3x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

**AAV2: Entfernen der Z-Schutzgruppe**

Das Z-geschützte Amin (1.00 mmol) wird in MeOH (10 mL) gelöst und zu Pd auf Aktivkohle (10wt%, 0.10 mmol) unter Ar-Atmosphäre gegeben. Die Reaktion wird unter Wasserstoffatmosphäre 12 h gerührt. Die Suspension wird über Celite filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt.

**AAV3: Biotinylierung der Amingruppe**

D-Biotin (0.20 mmol) wird in DMF (2 mL) gelöst und die Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Unter Ar-Atmosphäre erfolgt die Zugabe von HATU (0.20 mmol) und DMAP (0.02 mmol). Nach 10 min erfolgt die Zugabe des Amins (0.05 mmol) sowie Collidin (0.50 mmol). Es wird weitere 12 h bei RT gerührt. Zur Reaktionsmischung wird EE (30 mL) gegeben und mit Salzsäure (0.1 N, 3x 20 mL), NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (halbgas., 3x 20 mL) und dest. Wasser (3x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird über LC gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH).

**AAV4: Reduktion der Nitrogruppe**

Die Nitroverbindung (2.07 mmol) wird in Ethanol (25 mL) gelöst und anschließend wird Zinn(II)chlorid (1.96 g, 10.31 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird bei 80 °C 2.5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegeben und der pH-Wert wird mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 7-8 eingestellt. Anschließend wird mit Ethylacetat (3x 75 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit NaCl-Lösung (ges., 50 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

**AAV5: Synthese der *N*-(Phenylcarbamothioyl)benzamide**

Zu Benzoylisothiocyanat (6.4 mmol) in trockenem Aceton (15 mL) wird das Anilinderivat (6.4 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wird 2 h bei 40 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Eis gegeben, der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Wasser (20 mL) und Hexan (20 mL) gewaschen und an Luft getrocknet.

**AAV6: Entschützung der Aminfunktion**

*N*-(Phenylcarbamothioyl)benzamid (2.5 mmol) wird in NaOH-Lösung (10%, 10 mL) gelöst und über Nacht bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird anschließend auf Eis gegossen und mit Salzsäure (konz.) angesäuert (pH 5-6). Der gebildete Niederschlag wird filtriert, mit kaltem Wasser und Hexan gewaschen und an Luft getrocknet.

**AAV7: Synthese der Imidazolacetophenone**

Imidazol (36.0 mmol), 4-Fluoracetophenon (30.0 mmol) und Kaliumcarbonat (30.0 mmol) werden in DMF suspendiert und 12 h bei 95 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf Eiswasser gegeben, wobei das Produkt ausfällt. Falls es nicht zur Fällung kommt, wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) zugegeben und mit Wasser (3x 50 mL) und NaCl-Lösung (ges., 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird über LC gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1). Um die Reaktionszeit zu verkürzen, kann die Synthese auch in der Mikrowelle erfolgen. Dabei werden die Komponenten für 2-3 min bei 220 Watt umgesetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

**AAV8: Bromierung der Imidazolacetophenone**

Das Imidazolacetophenon (2.0 mmol) wird in Bromwasserstoff (30%, in Eisessig, 3.5 mL) gelöst. Unter Rühren wird Brom (2.0 mmol) hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wird 1.5 h bei r.t. gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Lösung auf Eiswasser gegeben, wobei das Produkt ausfällt. Dieses wird abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Die Trocknung erfolgt im Hochvakuum. Falls es nicht zur Fällung kommt, wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben und mit Wasser (3x 50 mL) und NaCl-Lösung (ges., 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

**AAV9: Synthese der Aminothiazole**

Das Brommethylketon (1.0 mmol) und Phenylthioharnstoff (1.0 mmol) werden in MeOH oder DMF (3 mL) gelöst und die Reaktionsmischung wird 6 h bei 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung auf Eiswasser gegeben und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) zugegeben. Die organische Phase wird mit Wasser (3x 25 mL) und NaCl-Lösung (ges., 25 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird über LC gereinigt (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 100:1).

**AAV10: Synthese der Thiazolylharnstoffe**

Das Brommethylketon (5.6 mmol) wird in Ethanol (25 mL) gelöst und Thioharnstoff (5.6 mmol) wird zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 0.5-12 h bei 80 °C erhitzt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH und mit kaltem Diethylether (25 mL) gewaschen. Zur



Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE oder  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst/suspendiert und mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3x 25 mL) und  $\text{NaCl}$ -Lsg. (ges., 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Kommt es nicht zur Fällung wird Wasser (50 mL) und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) zugegeben. Die organische Phase wird mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3x 25 mL), Wasser (3x 25 mL) und  $\text{NaCl}$ -Lösung (ges., 25 mL) gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt.

#### **AAV11: Synthese der Boc-geschützten Amino-thiazole**

*N*-Boc-Ala (4.64 mmol) und das Hydrobromidsalz (4.64 mmol) werden in trockenem Pyridin (70 mL) gelöst. Die Lösung wird auf  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und Phosphorylchlorid (5.10 mmol) wird tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird zunächst 0.5 h bei  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  und schließlich bei r.t. über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Eiswasser (50 g) wird mit Ethylacetat (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (EE/Hexane 1:1).

#### **AAV12: Boc-Entschützung**

Das *N*-Boc geschützte Thiazol (1.28 mmol) wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) gelöst und Trifluoessigsäure (12.80 mmol) wird zugegeben. Die Reaktionslösung wird bei r.t. über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel und Trifluoessigsäure wird unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Feststoff wird in Diethylether digeriert. Das TFA-Salz wird nach Filtration als Feststoff erhalten.

#### **AAV13: Amidkupplung mit EDAC/HOBt**

3,4-Difluorphenylelessigsäure (1.08 mmol) wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) gelöst und EDAC (1.08 mmol) wird zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt, HOBt (1.08 mmol) und Diisopropylethylamin (1.08 mmol) wird zugegeben und das Gemisch wird weitere 0.5 h bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Eine Lösung des TFA-Salzes (0.98 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) und Diisopropylethylamin (3.28 mmol) wird tropfenweise zugegeben und die Lösung wird bei RT 12 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit Salzsäure (0.1 N, 3x 20 mL), Wasser (3x 25 mL),  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (halbges., 3x 20 mL) und  $\text{NaCl}$ -Lösung (ges., 25 mL)

gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (EE/Hexane 1:1).

#### **AAV14: Synthese der Thiazolylharnstoffe**

Das Isocyanat (0.17 mmol) wird in trockenem DMSO (3 mL) gelöst und das Thiazolyllamin (0.19 mmol) wird zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung auf Eiswasser gegeben und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL) zugegeben. Die organische Phase wird mit Salzsäure-Lösung (0.1 N, 3x 20 mL), Wasser (3x 20 mL) und NaCl-Lösung (ges., 20 mL) gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird über LC gereinigt ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

#### **AAV15: Synthese der Pyrdinylharnstoffe**

Das Aminopyridin (0.8 mmol) und das Benzylisocyanat (0.8 mmol) werden in trockenes Aceton (5 mL) gegeben und ca. 24 h bei 45 °C erhitzt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und mit wenig Aceton gewaschen. Das Filtrat wird anschließend auf Eis gegeben, der Feststoff wird abfiltriert und mit kaltem Wasser und Hexan gewaschen. Zur Aufreinigung wird das Rohprodukt aus einem Ethylacetat-Hexan-Gemisch (1:1) umkristallisiert.

#### **AAV16: Synthese der Pyrdinylthioharnstoffe**

Das Aminopyridin (0.7 mmol) und das Benzylothiocyanat (0.7 mmol) bzw. Benzoylothiocyanat (0.7 mmol) werden in Aceton (5 mL) gegeben und ca. 24 h bei 45 °C erhitzt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und mit wenig Aceton gewaschen. Das Filtrat wird anschließend auf Eis gegeben, der Feststoff wird abfiltriert und mit kaltem Wasser und Hexan gewaschen. Zur Aufreinigung wird das Rohprodukt aus einem Ethylacetat-Hexan-Gemisch (1:1) umkristallisiert.

#### **AAV17: Isopropylesterentschüttung**

Der Isopropylester (2.77 mmol) wird in Methanol (15 mL) gelöst, mit NaOH (2N, 4 mL) versetzt und 4–12 h bei RT gerührt oder gegebenenfalls auf 70 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mit HCl (2N) auf pH 2 angesäuert. Anschließend wird mit Ethylacetat (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (3x 25 mL) und NaCl-Lösung (ges., 25 mL) gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan oder durch LC (EE/Hexan).

**AAV18: N-Alkylierung von Fenofibrat**

In eine Suspension von NaH (1.2 mmol) in DMF (5 mL) wird bei 0 °C eine Lösung des Oxims (1.00 mmol) gegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C ca. 1 h gerührt und das Alkylhalogenid (1.2 mmol) gelöst in DMF wird zugegeben. Das Eisbad wird entfernt und die Mischung wird 6–12 h bei r.t. gerührt. Zur Reaktionsmischung wird NH<sub>4</sub>Cl (ges., 25 mL) und Ethylacetat (50 mL) zugegeben und die Lösung wird mit Wasser (50 mL) gewaschen. Die wässrige Lösung wird mit Ethylacetat extrahiert (3x 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Salzsäure (0.1N, 2x 25 mL), H<sub>2</sub>O (3x 25 mL), und NaCl-Lösung (ges., 3x 25 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird durch LC (EE/Hexan) gereinigt.

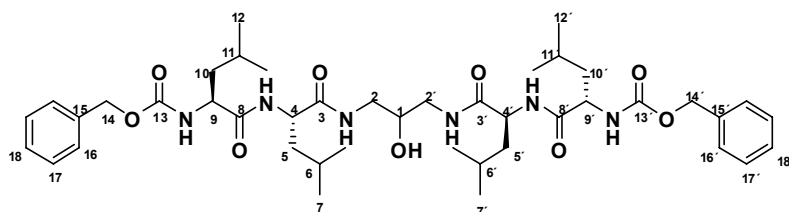
**AAV19: Synthese der Fenofibrat-Dimere**

In eine Suspension von NaH (2.2 mmol) in DMF (5 mL) wird bei 0 °C eine Lösung des Oxims (2.2 mmol) gegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C ca. 1 h gerührt und das Alkylhalogenid (1.0 mmol) gelöst in DMF wird zugegeben. Das Eisbad wird entfernt und die Mischung wird 6–12 h bei r.t. gerührt. Zur Reaktionsmischung wird NH<sub>4</sub>Cl (ges., 25 mL) und Ethylacetat (50 mL) zugegeben und die Lösung wird mit Wasser (50 mL) gewaschen. Die wässrige Lösung wird mit Ethylacetat extrahiert (3x 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Salzsäure (0.1N, 2x 25 mL), H<sub>2</sub>O (3x 25 mL), und NaCl-Lösung (ges., 3x 25 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird durch LC (EE/Hexan) gereinigt.

## 5.3 Synthesen

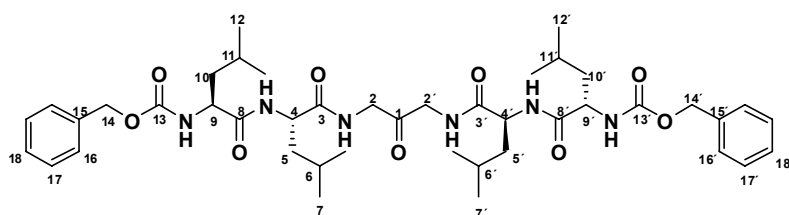
### 5.3.1 Peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

#### Benzyl-(4*S*,7*S*,15*S*,18*S*)-11-hydroxy-7,15-diisobutyl-2,20-dimethyl-5,8,14,17-tetraoxo-6,9,13,16-tetraazahenicosan-4,18-diylldicarbamat (**80**)



Nach AAV1 wird Z-Leu-Leu (378 mg, 1.00 mmol) mit 1,3-Diaminopropan-2-ol (45 mg, 0.5 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 353 mg (87%) von **80** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.68, HPLC (Methode 1):  $t_r$  = 8.40 min (92%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 7.89 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, NH), 7.86 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, NH), 7.46 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, NH), 7.34-7.32 (m,  $10\text{H}^{Ph}$ ), 5.03 (s, 4H, H-14/14'), 4.92 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H, OH), 4.32 (m, 1H, H-1), 4.05 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 4H, H-9/-9'/-4/-4'), 3.36-3.09 (m, 4H, H-2/2'), 2.01-1.99 (m, 8H, H-10/-10'/-5/-5'), 1.25-1.16 (m, 4H, H-11/-11'/-6/-6'), 0.91-0.80 (m, 24H, H-12/-12'/-7/-7') ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 834  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### Benzyl-(4*S*,7*S*,15*S*,18*S*)-7,15-diisobutyl-2,20-dimethyl-5,8,11,14,17-pentaoxo-6,9,13,16-tetraazahenicosane-4,18-diylldicarbamat (**75**)



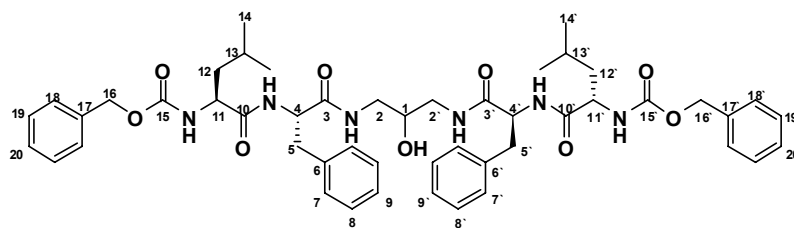
Methode (a) Nach AAV1 wird Z-Leu-Leu (95 mg, 0.25 mmol) mit 1,3-Diaminopropan-2-on (23 mg, 0.125 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 63 mg (62%) von **75** als farbloser Feststoff.

Methode (b) DMSO (5 mL) wird zu dem Alkohol **80** (40 mg, 0.05 mmol) und IBX (28 mg, 0.10 mmol) gegeben und 12-18 h bei RT gerührt. Es wird  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) und Wasser (20 mL) zugegeben. Der ausfallende Niederschlag wird abfiltriert. Nach Abtrennung der organischen Phase wird diese mit Wasser (4x 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Ausbeute: 40 mg (quant.) von **75** als farbloser Feststoff.

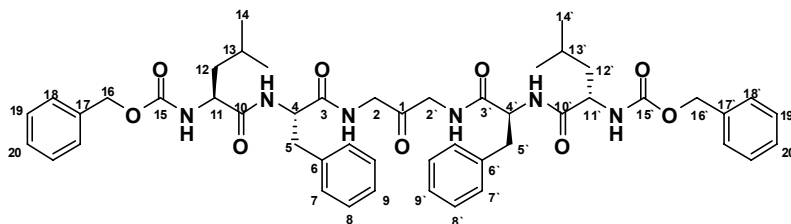
$R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.71, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 8.6 min (96%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.33-7.27 (m,  $10\text{H}^{Ph}$ ), 7.02 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, NH), 6.82 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, NH), 5.94 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, NH), 5.08 (s, 4H, H-14/14'), 4.72-4.39 (m, 4H, H-9/-9'/-4/-4'), 4.11-3.86 (m, 4H, H-2/2'), 1.94-1.40 (m, 8H, H-10/-10'/-5/-5'), 1.38-1.18 (m, 4H, H-11/-11'/-6/-6'), 1.04-0.72 (m, 24H, H-12/-12'/-7/-7') ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 202.8 (C-1), 172.9 (C-3/-3'), 172.5 (C-8/8'), 155.4 (C-13/-13'), 136.1 (C-15/-15'), 128.6 (C-17/-17'), 128.3 (C-18/-18'), 128.0 (C-16/-16'), 67.2 (C-14/-14'), 52.8 (C-9/-9'), 51.9 (C-4/-4'), 47.6 (C-2/-2'), 40.5 (C-5/-5'/-10/-10'), 24.8 (C-6/-6'/-11/-11'), 22.9 (C-7/-7'/-12/-12') ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 832  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Benzyl-(4*S*,7*S*,15*S*,18*S*)-7,15-dibenzyl-11-hydroxy-2,20-dimethyl-5,8,14,17-tetraoxo-6,9,13,16-tetraazahenicosan-4,18-diylidicarbamat (**81**)**



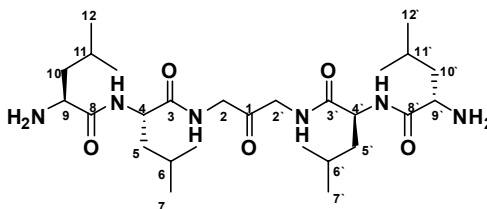
Nach AAV1 wird Z-Leu-Phe (206 mg, 0.50 mmol) mit 1,3-Diaminopropan-2-ol (23 mg, 0.25 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 153 mg (70%) von **81** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.72, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 8.66 min (94%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.96-7.95 (m, 4H, NH), 7.43-7.31 (m, 18H,  $\text{H}^{Ph}$ , NH), 7.22-7.16 (m,  $4\text{H}^{Ph}$ ), 5.07 (s, 4H, H-16/16'), 4.94 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, OH), 4.53-4.51 (m, 2H, H-4/-4'), 4.04-3.98 (m, 2H, H-11/-11'), 3.50 (m, 1H, H-1), 3.36-3.29 (m, 4H, H-2/2'), 3.04-2.86 (m, 4H, H-5/-5'), 2.82-2.77 (m, 4H, H-12/-12'), 1.36-1.16 (m, 2H, H-13/-13'), 0.84-0.73 (m, 12H, H-14/-14') ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 902  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Benzyl-(4*S*,7*S*,15*S*,18*S*)-7,15-dibenzyl-2,20-dimethyl-5,8,11,14,17-pentaoxo-6,9,13,16-tetraazahenicosan-4,18-diyl dicarbamat (77)**



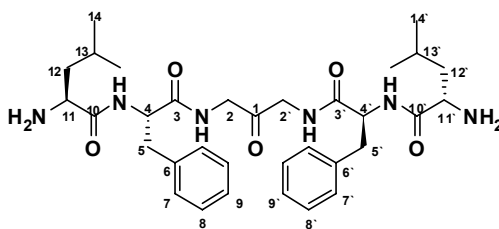
Nach AAV1 wird Z-Leu-Phe (412 mg, 1.00 mmol) mit 1,3-Diaminopropan-2-on (90 mg, 0.50 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 265 mg (56%) von **77** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.75, HPLC (Methode 1):  $t_r$  = 9.4 min (89%).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.68 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, NH), 7.42-7.22 (m, 20H<sup>Ph</sup>), 6.82 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, NH), 6.58 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, NH), 5.02 (s, 4H, H-16/16'), 4.56-4.34 (m, 4H, H-11/-11'/-4/-4'), 4.02-3.36 (m, 4H, H-2/2'), 3.13-2.74 (m, 4H, H-5/-5'), 1.94-1.51 (m, 4H, H-12/-12'), 1.33-1.06 (m, 2H, H-13/-13'), 0.98-0.72 (m, 12H, H-14/-14') ppm. MS (ESI)  $m/z$  = 899  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**(*S*,2*S*,2'*S*)-*N,N'*-(2-Oxopropan-1,3-diyl)bis(2-((*S*)-2-amino-4-methylpentanamido)-4-methylpentanamid) (82)**



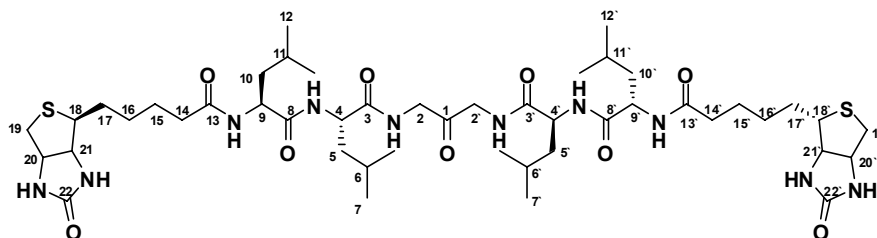
Nach AAV2 wird das Z-geschützte Amin **75** (20 mg, 0.03 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 16 mg (quant.) von **82** als farbloses Öl,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.22, HPLC (Methode 1):  $t_r$  = 0.66 min (100%).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.10-7.85 (m 4H, NH), 7.61 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, NH), 4.47-4.36 (m, 2H, H-4/-4'), 3.87-3.69 (m, 4H, H-2/2'), 3.18-2.93 (m, 2H, H-9/-9'), 1.62-1.28 (m, 12H, H-10/-10'/-5/-5'/-11/-11'/-6/-6'), 1.11-0.92 (m, 24H, H-12/-12'/-7/-7') ppm. MS (ESI)  $m/z$  = 564  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**(2*S*,2'*S*)-*N,N'*-((2*S*,2'*S*)-1,1'-(2-Oxopropan-1,3-diyl)bis(azanediyl)bis(1-oxo-3-phenylpropan-2,1-diyl))bis(2-amino-4-methylpentanamid) (78)**



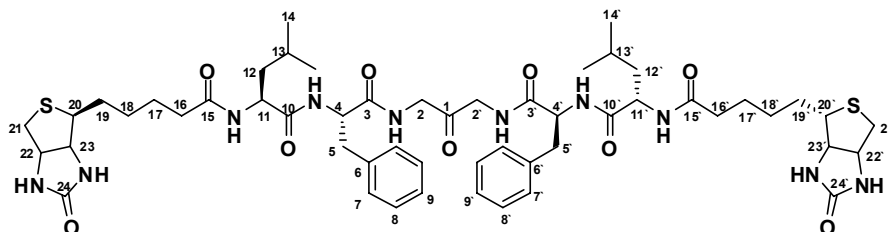
Nach AAV2 wird das *Z*-geschützte Amin **77** (40 mg, 0.05 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 30 mg (quant.) von **78** als farbloses Öl,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.28, **HPLC** (Methode 2):  $t_r$  = 0.9 min (87%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8.35 (d,  $J$  = 5.3, 2H, NH), 8.00 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, NH), 7.40-7.31 (m, 8H, 6H<sup>Ph</sup>, NH), 7.24-7.16 (m, 4H<sup>Ph</sup>), 4.59-4.58 (m, 2H, H-4/-4'), 4.02-3.95 (m, 4H, H-2/2'), 3.06-3.01 (m, 2H, H-11/-11'), 2.87-2.80 (m, 4H, H-5/-5'), 1.36-1.34 (m, 2H, H-13/-13'), 1.31-1.29 (m, 2H, H-12/-12'), 0.82-0.71 (m, 12H, H-14/-14') ppm. **MS (ESI)**  $m/z$  = 631  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**(*S,S*,2*S*,2'*S*)-*N,N'*-(2-Oxopropan-1,3-diyl)bis(4-methyl-2-((2*S*)-4-methyl-2-(5-((4*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thien[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanamido)pentanamid) (83)**



Nach AAV3 wird das Amin **82** (60 mg, 0.11 mmol) mit D-Biotin (104 mg, 0.43 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 72 mg (66%) von **83** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.42, **HPLC** (Methode 3, 320 nm):  $t_r$  = 1.9 min (91%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 8.99 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, NH), 7.79 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 2H, NH), 7.53-7.50 (m, 2H, NH), 6.45-6.38 (m, 4H, NH), 4.43-4.33 (m, 2H, H-20/20'), 4.30-4.14 (m, 2H, H-21/21'), 4.12-3.78 (m, 4H, H-9/-9'/-4/-4'), 3.50-3.36 (m, 4H, H-2/2'), 2.84-2.80 (m, 2H, H-18/-18'), 2.69-2.50 (m, 4H, H-19/-19'), 2.21 (t,  $J$  = 7.3, 4H, H-14/-14'), 1.59-1.33 (m, 20H, H-5/-5'/-6/-6'/-10/-10'/-11/-11'/-15/-15'/-17/-17'), 1.22-1.99 (m, 4H, H-16/-16'), 0.88-0.83 (m, 24H, H-12/-12'/-7/-7') ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 1016  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**(*S*,2*S*,2'*S*)-*N*,*N'*-((2*S*,2'*S*)-1,1'-(2-Oxopropan-1,3-diyl)bis(azanediyl)bis(1-oxo-3-phenylpropan-2,1-diyl))bis(4-methyl-2-(5-((4*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanamide) (83)**

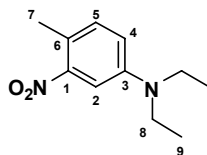


Nach AAV3 wird das Amin **78** (30 mg, 0.05 mmol) mit D-Biotin (49 mg, 0.2 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 24 mg (45%) von **83** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (EE/MeOH 10:1) = 0.46, HPLC (Methode 1):  $t_r$  = 2.9 min (86%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 8.61 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H, NH), 8.21-8.06 (d, 4H, NH), 7.15-7.11 (m, 10H<sup>*Ph*</sup>), 6.46-6.36 (m, 4H, NH), 4.31-4.13 (m, 2H, H-22/22'), 3.97-3.62 (m, 2H, H-23/-23'), 3.86-3.62 (m, 4H, H-11/-11'/-4/-4'), 3.49-3.44 (m, 4H, H-2/2'), 2.74-2.51 (m, 2H, H-20/-20'), 2.10 (s, 4H, H-21/-21'), 1.99 (s, 4H, H-16/-16'), 1.77-1.31 (m, 18H, H-5/-5'/-12/-12'/-13/-13'/-17/-17'/-19/-19'), 1.09-1.07 (m, 4H, H-18/-18'), 0.98-0.83 (m, 12H, H-14/-14') ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 1083 [M+Na]<sup>+</sup>.



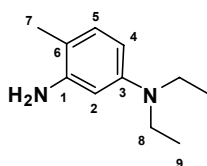
### 5.3.2 Semi-peptidische und nicht-peptidische $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren

#### *N,N*-Diethyl-4-methyl-3-nitroanilin (**102**)

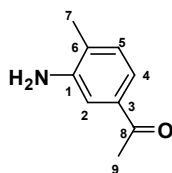


4-Methyl-3-nitroanilin (1.20 g, 7.89 mmol) und Kaliumcarbonat (2.72 g, 19.71 mmol) werden in DMF (20 mL) gelöst. Anschließend wird Ethyliodid (1.6 mL, 3.08 g, 19.71 mmol) langsam zutropft. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung wird Wasser (200 mL) und Ethylacetat (200 mL) zugegeben. Nach Abtrennung der organischen Phase wird diese mit Wasser (4x 50 mL) und NaCl-Lösung (ges., 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es folgt eine Reinigung durch LC (EE/Cyclohexan 4:1). Ausbeute: 0.45 g (69%) von **102** als oranges Öl,  $R_f$  (EE/CH 4:1) = 0.81. **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.2 min (93%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.16 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-5), 7.15 (s, 1H, H-2), 7.05 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-4), 3.29 (q,  $J$  = 6.8 Hz, H4, H-8), 2.37 (s, 3H, H-7), 1.12 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, H-9) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 150.6 (C-1), 146.0 (C-3), 133.2 (C-5), 119.0 (C-6), 116.5 (C-4), 107.0 (C-2), 44.5 (C-8), 19.3 (C-7), 12.3 (C-9) ppm.

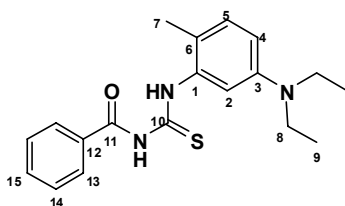
#### *N,N*-Diethyl-4-methylbenzol-1,3-diamin (**90**)



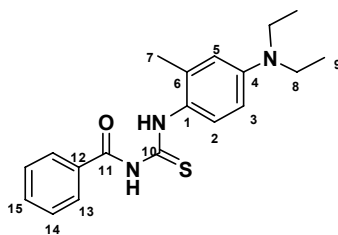
Nach AAV4 wird **102** (430 mg, 2.07 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 328 mg (89%) von **90** als gelbes Öl,  $R_f$  (EE/CH 1:4) = 0.16, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 1.2 min (92%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 6.82 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-5), 6.06 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-4), 6.03 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, H-2), 3.22 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, H-8), 1.12 (s, 3H, H-7), 1.05 (t,  $J$  = 7.05 Hz, 6H, H-9) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 146.8 (C-1), 145.3 (C-3), 131.1 (C-5), 111.7 (C-6), 103.7 (C-4), 102.6 (C-2), 44.5 (C-8), 15.2 (C-7), 12.6 (C-9) ppm.

**1-(3-Amino-4-methylphenyl)ethanon (135)**

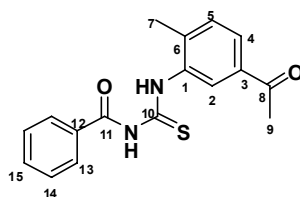
Nach AAV4 wird 1-(4-Methyl-3-nitrophenyl)ethanon (400 mg, 2.23 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 275 mg (82%) von **135** als gelber Feststoff,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.10, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 1.2 min (92%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.22 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H, H-5), 7.06 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1H, H-2), 7.03 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, H-4), 2.50 (s, 3H, H-9), 2.14 (s, 3H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 197.2 (C-8), 143.7 (C-1), 135.3 (C-3), 129.5 (C-5), 127.1 (C-6), 118.1 (C-4), 112.9 (C-2), 25.5 (C-9), 16.6 (C-7) ppm.

***N*-(5-(Diethylamino)-2-methylphenylcarbamothioyl)benzamid (103)**

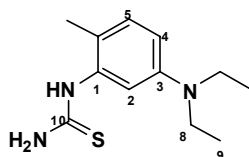
Nach AAV5 wird Benzoylisothiocyanat (1.04 g, 6.4 mmol) und das Anilin **90** (1.37 g, 6.4 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.46 g (67%) von **103** als gelber Feststoff,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.24, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.3 min (80%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 9.06 (s, NH), 7.82 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, H-13), 7.56 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, H-15), 7.48 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, H-14), 7.43 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5), 7.19 (s, 1H, H-2), 7.01 (d,  $J$  = 8.1 Hz, H-4), 3.26 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H, H-8), 2.19 (s, 3H, H-7), 1.11 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, H-9) ppm.

***N*-(4-(Diethylamino)-2-methylphenylcarbamoithiyl)benzamid (202)**

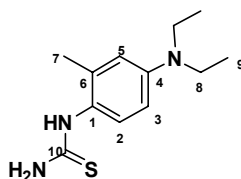
Nach AAV5 wird Benzoylisothiocyanat (1.04 g, 6.4 mmol) und *N,N*-Diethyl-3-methylbenzol-1,4-diaminhydrochlorid (1.37 g, 6.4 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.53 g (70%) von **202** als gelber Niederschlag,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.24, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.3 min (82%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 8.40 (s, NH), 8.04 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H-13), 7.56 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H-15), 7.48 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H-14), 6.56-6.34 (m, 3H, H-5/-2/-3), 3.45 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, H-8), 2.12 (s, 3H, H-7), 1.13 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H, H-9) ppm.

***N*-(5-Acetyl-2-methylphenylcarbamoithiyl)benzamid (136)**

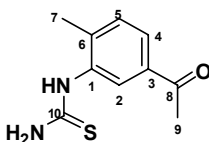
Nach AAV5 wird Benzoylisothiocyanat (100 mg, 0.61 mmol) und das Anilin **135** (91 mg, 0.61 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 146 mg (77%) von **136** als gelber Feststoff,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.45, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.86 min (89%).

**1-(5-(Diethylamino)-2-methylphenyl)thioharnstoff (88)**

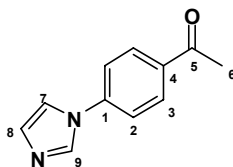
Nach AAV6 wird ?? (850 mg, 2.5 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 380 mg (64%) von **88** als farbloser Feststoff,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.22, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 0.95 min (91%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.60-7.57 (m, 2H, NH), (7.39 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H-5), 6.90 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H-6), 6.30 (s, 1H, H-2), 5.93-5.74 (m, 1H, NH), 3.27 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H, H-8), 1.18 (s, 3H, H-7), 1.08 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, H-9) ppm.

**1-(4-(Diethylamino)-2-methylphenyl)thioharnstoff (203)**

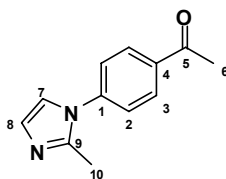
Nach AAV6 wird **202** (850 mg, 2.5 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 450 mg (76%) von **203** als farbloser Feststoff,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.22, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 0.95 min (89%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 6,53-6.38 (m, 2H, H-3/-5), 6.23 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H-2), 3.34 (q,  $J$  = 6.9 Hz, 4H, H-8), 2.08 (s, 3H, H-7), 1.12 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 6H, H-9) ppm.

**1-(5-Acetyl-2-methylphenyl)thioharnstoff (137)**

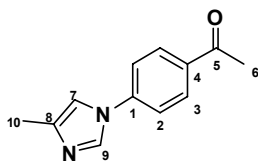
Nach AAV6 wird **136** (100 mg, 0.32 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 66 mg (87%) von **137** als hellgelber Feststoff,  $R_F$  (EE/CH 1:4) = 0.16, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 0.87 min (92%). **MS (EI):**  $m/z$  = 208  $[\text{M}]^+$ .

**1-(4-(1H-Imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (85)**

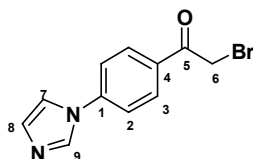
Nach AAV7 wird Imidazol (2.45 g, 36.0 mmol) mit 4-Fluoracetophenon (4.14 g, 30.0 mmol) und Kaliumcarbonat (4.15 g, 30.0 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 4.10 g (74%) von **85** als gelber Feststoff; 55% bei Reaktion mittels MW,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1) = 0.40, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.31 min (95%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8.01 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-3), 7.88 (s, 1H, H-7), 7.43 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-2), 7.18 (s, 1H, H-8), 7.17 (s, 1H, H-9), 2.57 (s, 3H, H-6) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 196.9 (C-5), 141.1 (C-1), 136.2 (C-4), 135.8 (C-9), 131.6 (C-8), 130.7 (C-1), 121.1 (C-1), 118.1 (C-7), 27.0 (C-6) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 186 ( $\text{M}^+$ ).

**1-(4-(2-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (204)**

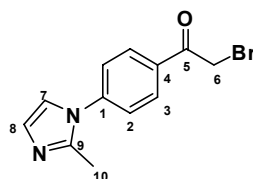
Nach AAV7 wird 2-Methyl-1*H*-imidazol (2.95 g, 36.0 mmol) mit 4-Fluoracetophenon (4.14 g, 30.0 mmol) und Kaliumcarbonat (4.15 g, 30.0 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 3.12 g (52%) von **204** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) = 0.44, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.74 min (93%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 8.01 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H, H-3), 7.34 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H-2), 6.99 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, H-7), 6.97 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, H-8), 2.58 (s, 3H, H-6), 2.35 (s, 3H, H-10) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 197.1 (C-5), 144.9 (C-9), 142.2 (C-1), 136.8 (C-4), 130.1 (C-3), 128.8 (C-2), 125.7 (C-8), 120.6 (C-7), 27.1 (C-6), 14.4 (C-10) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 200 ( $M^+$ ).

**1-(4-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (205)**

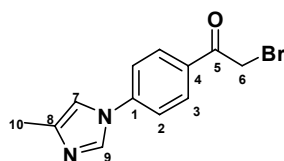
Nach AAV7 wird 4-Methyl-1*H*-imidazol (2.95 g, 36.0 mmol) mit 4-Fluoracetophenon (4.14 g, 30.0 mmol) und Kaliumcarbonat (4.15 g, 30.0 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 2.88 g (48%) von **205** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) = 0.35, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.10 min (92%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 8.00 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H, H-3), 7.80 (s, 1H, H-7), 7.38 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, H-2), 7.00 (t,  $J$  = 1.0 Hz, 1H, H-9), 2.55 (s, 3H, H-6), 2.38 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 3H, H-10) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 196.9 (C-5), 141.2 (C-1), 140.7 (C-8), 135.8 (C-4), 134.8 (C-9), 130.7 (C-3), 120.6 (C-2), 114.4 (C-7), 26.9 (C-6), 14.1 (C-10) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 200 ( $M^+$ ).

**2-Brom-1-(4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (84)**

Gemäß der AAV8 wird Methylketon **85** (3.50 g, 18.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 4.14 g (86%) von **84** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.52, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.52 min (87%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.94 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-3), 7.78 (s, 1H, H-7), 7.46 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-2), 7.19 (s, 1H, H-8), 7.17 (s, 1H, H-9), 4.56 (s, 2H, H-6) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 196.9 (C-5), 141.1 (C-1), 136.2 (C-9), 135.8 (C-4), 131.6 (C-8), 130.7 (C-2), 121.1 (C-3), 118.1 (C-7). 32.4 (C-6) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 265 (M<sup>+</sup>).

**2-Brom-1-(4-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (206)**

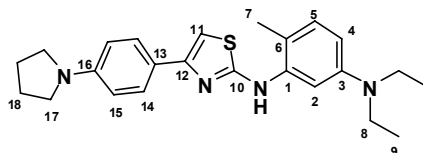
Nach AAV8 wird Methylketon **204** (400 mg, 2.00 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 424 mg (76%) von **206** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.54, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.58 min (90%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8.57 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 2H, H-3), 7.99 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H, H-2), 7.97 (s, 1H, H-7), 7.87 (s, 1H, H-8), 3.96 (s, 2H, H-6), 2.60 (s, 3H, H-10) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 184.5 (C-5), 143.4 (C-1), 137.3 (C-9), 130.7 (C-4), 129.4 (C-8), 128.8 (C-2), 125.0 (C-3), 117.2 (C-7), 41.6 (C-6), 10.1 (C-10) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 279 (M<sup>+</sup>).

**2-Brom-1-(4-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)phenyl)ethanon (207)**

Nach AAV8 wird Methylketon **205** (1.31 g, 6.50 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.34 g (74%) von **207** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.54, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.58 min (89%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.94 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H,

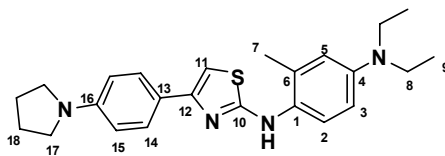
H-3), 7.67 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H-2), 7.58 (s, 1H, H-7), 7.26 (s, 1H, H-9), 4.59 (s, 2H, H-6), 2.26 (s, 3H, H-10) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 279$  ( $M^+$ ).

**$N^I, N^I$ -Diethyl-4-methyl- $N^3$ -(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzol-1,3-diamin (107, BSc3009)**



Nach AAV9 wird 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon (56 mg, 0.21 mmol) und Thioharnstoff **88** (50mg, 0.21 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 82 mg (97%) von **107** als violetter Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 0.75, **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 4.37$  min (94%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 9.48$  (s, 1H, NH), 7.77 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-14), 7.61 (s, 1H, H-11), 7.02 (s, 1H, H-4), 6.56 (d,  $J = 8.2$  Hz, 3H, H-15/H-5), 6.28 (s, 1H, H-2), 3.24-3.21 (m, 8H, H-8/-17), 2.28 (s, 3H, H-7), 1.98 (q, 4H, H-18), 1.16 (t,  $J = 7.8$  Hz, 6H, H-9).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 161.0$  (C-10), 147.1 (C-12), 147.1 (C-16), 130.3 (C-3), 130.0 (C-1), 126.6 (C-5), 124.0 (C-14), 120.9 (C-13), 116.4 (C-6), 111.5 (C-15), 109.8 (C-11), 104.0 (C-4), 99.5 (C-2), 52.5 (C-17), 48.5 (C-8), 24.9 (C-18), 18.4 (C-7), 10.0 (C-9) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 407.3$  ( $M+H$ ) $^+$ .

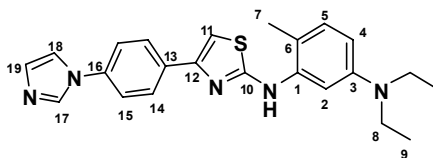
**$N^4, N^4$ -Diethyl-2-methyl- $N^I$ -(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzol-1,4-diamin (108, BSc3008)**



Nach AAV9 wird 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon (56 mg, 0.21 mmol) und Thioharnstoff **203** (50 mg, 0.21 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 68 mg (80%) von **108** als violetter Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 0.75, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.65$  min (93%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 9.48$  (s, 1H, NH), 7.77 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-14), 7.71 (s, 1H, H-11), 7.01 (s, 1H, H-4), 6.81 (s, 1H, H-3), 6.56 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-15), 5.77 (s, 1H, H-2), 3.48-3.41 (m, 4H, H-17), 3.38-3.24 (m, 4H, H-8), 2.41 (s, 3H, H-7), 1.07 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H, H-9).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 162.4$  (C-10), 150.3 (C-12), 147.1 (C-16), 130.3 (C-4), 129.2 (C-6), 127.4 (C-1), 126.6 (C-14), 120.9 (C-8), 118.9 (C-2),

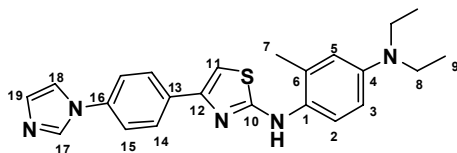
116.4 (C-5), 111.5 (C-15), 109.8 (C-3), 99.4 (C-11), 56.0 (C-17), 47.2 (C-8), 24.9 (C-18), 18.4 (C-7), 10.1 (C-9) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 407.3$  (M+H)<sup>+</sup>.

***N*<sup>3</sup>-(4-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-diethyl-4-methylbenzol-1,3-diamin (30, BSc3007)**



Nach AAV9 wird Bromacetophenon **84** (55 mg, 0.21 mmol) und Thioharnstoff **88** (50 mg, 0.21 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 42 mg (50%) von **30** als grüner Feststoff, **R<sub>F</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.66, **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 1.36$  min (94%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 8.33$  (s, 1H, NH), 8.02 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-14), 7.82 (s, 1H, H-11), 7.73 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-15), 7.48 (s, 1H, H-18), 7.39 (s, 1H, H-19), 7.12 (s, 1H, H-17), 6.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-5), 6.64 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-4), 6.36 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-2), 3.36-3.25 (m, 4H, H-8), 2.52 (s, 3H, H-7), 1.17 (t,  $J = 7.8$  Hz, 6H, H-9). **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 161.4$  (C-10), 152.6 (C-12), 147.1 (C-3), 142.4 (C-1), 136.7 (C-16), 131.4 (C-17), 130.8 (C-13), 129.2 (C-19), 128.4 (C-5), 126.8 (C-14), 120.4 (C-18), 119.8 (C-6), 177.6 (C-15), 105.4 (C-11), 102.5 (C-4), 100.6 (C-2), 46.9 (C-8), 19.1 (C-7), 11.7 (C-9) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 404$  (M+H)<sup>+</sup>.

***N*<sup>1</sup>-(4-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>-diethyl-2-methylbenzol-1,4-diamin (104, BSc3006)**

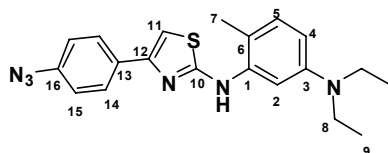


Nach AAV9 wird Bromacetophenon **84** (75 mg, 0.28 mmol) und Thioharnstoff **203** (67 mg, 0.28 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 67 mg (59%) von **104** als grüner Feststoff, **R<sub>F</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.64, **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 1.38$  min (96%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 8.33$  (s, 1H, NH), 8.02 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-14), 7.82 (s, 1H, H-11), 7.69 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-15), 7.47 (s, 1H, H-18), 7.36 (s, 1H, H-19), 7.11 (s, 1H, H-17), 6.99 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-5), 6.61 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-3), 6.34 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-2),



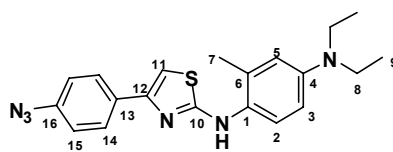
3.31-3.15 (m, 4H, H-8), 2.34 (s, 3H, H-7), 1.14 (t,  $J = 7.8$  Hz, 6H, H-9). **MS (ESI):**  $m/z = 404$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 426 ( $M+Na$ ).

***N*<sup>3</sup>-(4-(4-Azidphenyl)thiazol-2-yl)-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-diethyl-4-methylbenzol-1,3-diamin (**105**, BSc3005)**

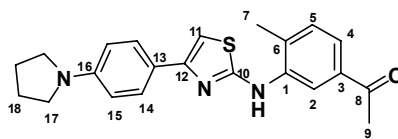


Nach AAV9 wird 1-(4-Azidphenyl)-2-bromethanon (50 mg, 0.21 mmol) und Thioharnstoff **84** (50 mg, 0.21 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 76 mg (96%) von **105** als brauner Feststoff,  $R_F$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1) = 0.80, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.58$  min (95%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta = 9.65$  (s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H-11), 7.97 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-14), 7.39-7.29 (m, 2H, H-4/-5), 7.19 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-15), 6.81 (s, 1H, H-2), 3.48-3.39 (m, 4H, H-8), 2.44 (s, 3H, H-7), 1.07 (t,  $J = 6.2$  Hz, 6H, H-9). **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta = 160.6$  (C-10), 150.0 (C-12), 144.1 (C-3), 144.5 (C-16), 142.4 (C-1), 132.3 (C-13), 129.2 (C-5), 128.4 (C-15), 126.6 (C-14), 120.9 (C-8), 118.3 (C-6), 108.5 (C-11), 104.8 (C-4), 101.4 (C-2), 46.4 (C-8), 18.6 (C-7), 11.4 (C-9) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 351$  ( $M-N_2$ ), 379 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

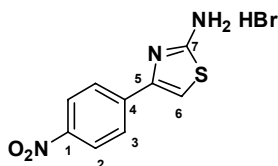
***N*<sup>1</sup>-(4-(4-Azidphenyl)thiazol-2-yl)-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>-diethyl-2-methylbenzol-1,4-diamin (**106**, BSc3004)**



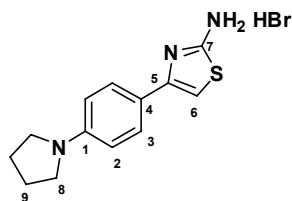
Nach AAV9 wird 1-(4-Azidphenyl)-2-bromethanon (200 mg, 0.85 mmol) und Thioharnstoff **203** (204 mg, 0.85 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 276 mg (86%) von **106** als brauner Feststoff,  $R_F$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1) = 0.80, **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 5.26$  min (97%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta = 9.57$  (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, H-11), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-14), 7.71-7.56 (m, 2H, H-3/-5), 7.41 (s, 1H, H-2), 7.17 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-15), 3.49-3.41 (m, 4H, H-8), 2.38 (s, 3H, H-7), 1.06 (t,  $J = 4.8$  Hz, 6H, H-9). **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta = 162.4$  (C-10), 151.2 (C-12), 146.3 (C-16), 142.4 (C-4), 134.1 (C-13), 132.2 (C-1), 129.2 (C-6), 128.4 (C-15), 126.6 (C-14), 120.9 (C-3), 117.3 (C-2), 114.5 (C-5), 105.8 (C-11), 44.6 (C-8), 17.8 (C-7), 11.8 (C-9) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 351$  ( $M-N_2$ ), 379 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

**1-(4-Methyl-3-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-ylamino)phenyl)ethanon (132)**

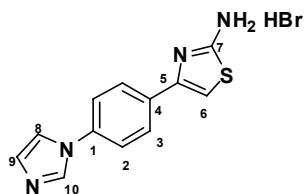
Nach AAV9 wird 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon (128 mg, 0.48 mmol) und Thioharnstoff **137** (100 mg, 0.48 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 134 mg (74%) von **132** als gelber Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 0.68,  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.37 (s, 1H, NH), 7.63 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-14), 7.59 (s, 1H, H-11), 7.39 (m, 1H, H-5), 7.26 (m, 1H, H-2), 6.53 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, H-15), 6.47 (s, 1H, H-4), 3.28-3.25 (m, 4H, H-17), 2.37 (s, 3H, H-9), 2.07 (s, 3H, H-7), 1.97-1.94 (m, 4H, H-18).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 197.8 (C-8), 166.2 (C-10), 152.1 (C-12), 148.2 (C-16), 139.7 (C-1), 136.8 (C-3), 134.6 (C-6), 133.4 (C-5), 131.6 (C-14), 128.6 (C-13), 124.1 (C-4), 112.0 (C-15/-3), 99.4 (C-11), 48.2 (C-17), 27.0 (C-9), 25.9 (C-18), 18.5 (C-7) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 378 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-amin-Hydrobromid (96)**

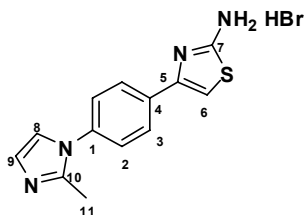
Nach AAV10 wird 2-Brom-1-(4-nitrophenyl)ethanon (1.50 g, 6.15 mmol) mit Thioharnstoff (467 mg, 6.15 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.82 g (92%) von **96** als gelber Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 3.42, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 2.90 min (98%).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}$ ):  $\delta$  = 8.30-8.27 (m, 2H, H-2), 8.02-7.99 (m, 2H, H-3), 7.50 (s, 1H, H-6), 3.44 (q, 2H, NH) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO}$ ):  $\delta$  = 169.6 (C-7), 150.2 (C-5), 146.7 (C-1), 137.3 (C-2), 126.6 (C-3), 124.1 (C-2), 107.0 (C-6) ppm.

**4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin-Hydrobromid (208)**

Nach AAV10 wird 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethanon (1.50 g, 5.60 mmol) mit Thioharnstoff (426 mg, 5.60 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.59 g (87%) von **208** als brauner Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.66, HPLC (Methode 1):  $t_r$  = 2.89 min (100%). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.82-7.61 (m, 2H, H-2), 7.50 (s, 1H, H-6), 7.32-7.22 (m, 2H, H-3), 3.46-3.41 (m, 4H, H-6), 1.98-1.89(m, 4H, H-9) ppm.

**5-(4-(1H-Imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin-Hydrobromid (209)**

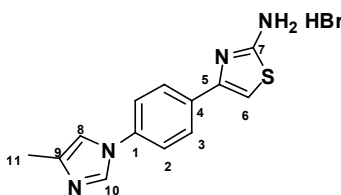
Nach AAV10 wird **84** (500 mg, 1.89 mmol) mit Thioharnstoff (144 mg, 1.89 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 370 mg (81%) von **209** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2) = 0.80, HPLC (Methode 4):  $t_r$  = 3.97 min (100%). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD):  $\delta$  = 8.34 (s, 1H, H-8), 7.97 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, H-3), 7.82 (s, 1H, H-6), 7.70 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, H-3), 7.14-7.17 (m, 2H, H-9/10) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, MeOD):  $\delta$  = 168.7 (C-7), 149.2 (C-5), 136.0 (C-1), 135.8 (C-10), 133.8 (C-4), 130.2 (C-9), 127.1 (C-3), 120.6 (C-8), 118.2 (C-2), 102.3 (C-6) ppm. MS (EI):  $m/z$  = 243 (M)<sup>+</sup>.

**4-(4-(2-Methyl-1H-imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin-Hydrobromid (210)**

Nach AAV10 wird **206** (70 mg, 0.25 mmol,) mit Thioharnstoff (19 mg, 0.25 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 57 mg (68%) von **210** als gelber Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH

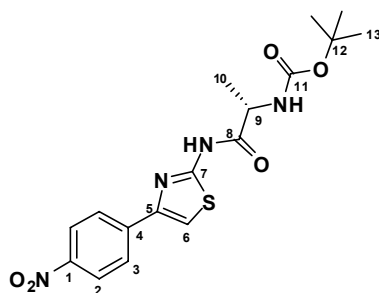
8:2) = 0.80, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.16 min (98%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 7.79-7.68- (m, 5H, H-2/-3/-8), 7.39 (s, 1H, H-6), 7.06 (s, 1H, H-9), 4.78 (s, breit, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.51 (s, 3H, H-11) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 173.3 (C-7), 140.2 (C-5), 138.7 (C-10), 135.2 (C-1), 132.4 (C-4), 130.8 (C-9), 128.5 (C-3), 122.4 (C-8), 118.2 (C-2), 104.8 (C-6), 12.4 (C-11) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 257 ( $\text{M}$ )<sup>+</sup>.

#### 5-(4-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin-Hydrobromid (**211**)



Nach AAV10 wird **207** (440 mg, 1.58 mmol) mit Thioharnstoff (120 mg, 1.58 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 360 mg (89%) von **211** als gelber Feststoff, **R<sub>F</sub>** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2) = 0.57, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.15 min (98%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 7.75-8.00 (m, 6H, H-2/-3/-8/-10), 7.32 (s, 1H, H-6), 4.86 (s, breit, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.50 (s, 3H, H-11) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 173.3 (C-7), 139.3 (C-5), 137.7 (C-9), 135.2 (C-1), 133.3 (C-10), 131.5 (C-4), 129.5 (C-3), 124.5 (C-8), 119.5 (C-2), 106.2 (C-6), 10.3 (C-11) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 257 ( $\text{M}$ )<sup>+</sup>.

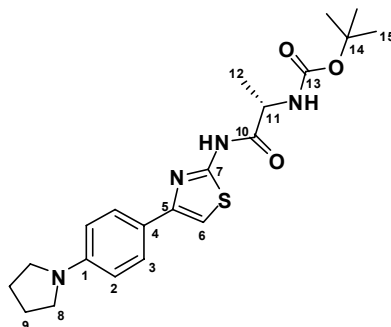
#### (*S*)-*tert*-Butyl-1-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylcarbamat (**95**)



Nach AAV11 wird **96** (1.40 g, 4.64 mmol) mit *N*-Boc-Ala (880 mg, 4.64 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.24 g (65%) von **95** als gelben Feststoff, **R<sub>F</sub>** (EE/H 1:1) = 0.45, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 7.36 min (95%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 8.28 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H, H-3), 8.15 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2), 7.70 (s, 1H, H-6), 4.36 (s, 1H, H-9), 1.48-1.26 (m, 12H, H-10/-13) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 172.8 (C-8), 159.9

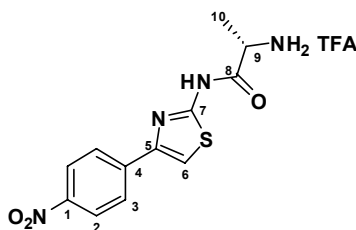
(C-7), 150.0 (C-11), 148.4 (C-1), 141.8 (C-4), 127.7 (C-3), 125.0 (C-2), 112.8 (C-6), 80.8 (C-12), 51.6 (C-9), 28.7 (C-13), 18.0 (C-10) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 415$  ( $M+Na$ )<sup>+</sup>.

**(S)-tert-butyl 1-oxo-1-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-ylamino)propan-2-yl-carbamate (212)**

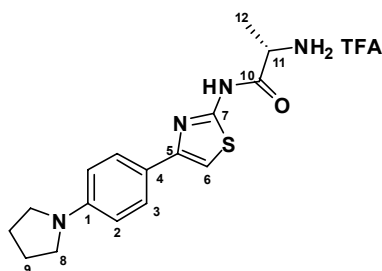


Nach AAV11 wird **208** (1.50 g, 4.60 mmol) mit *N*-Boc-Ala (870 mg, 4.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 1.24 g (65%) von **212** als hellbrauner Feststoff, **R<sub>F</sub>** (EE/H 1:1) = 0.48, **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 7.95$  min (92%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7.68$  (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-3), 7.26 (s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H-6), 6.58 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2), 5.20 (s, 1H, NH), 4.43 (s, 1H, H-11), 3.31 (s, 4H, H-8), 2.50 (s, 4H, H-9), 1.44 (s, 12H, H-12/-15) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 170.9$  (C-10), 157.5 (C-7), 155.5 (C-13), 150.8 (C-5), 147.8 (C-1), 127.2 (C-3), 121.92 (C-4), 111.7 (C-2), 104.2 (C-6), 81.2 (C-14), 50.2 (C-11), 47.6 (C-8), 28.3 (C-15), 25.5 (C-9), 17.9 (C-12) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 417$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 439 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>.

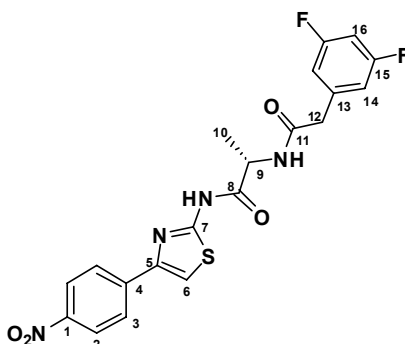
**(S)-2-Amino-N-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)propanamid (94)**



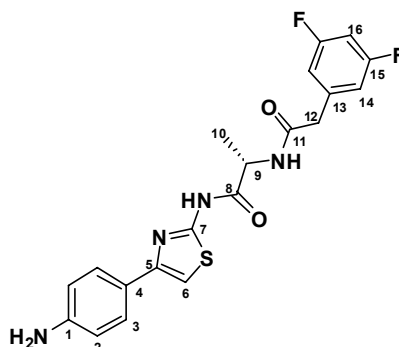
Nach AAV12 wird **95** (500 mg, 1.28 mmol) mit Trifluoressigsäure (980  $\mu$ l, 12.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 526 mg (quant.) von **94** als gelber Feststoff, **R<sub>F</sub>** (EE/H 1:1) = 0.15, **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 1.16$  min (96%). Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.<sup>[182]</sup>

**(S)-2-Amino-N-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)propanamid (213)**

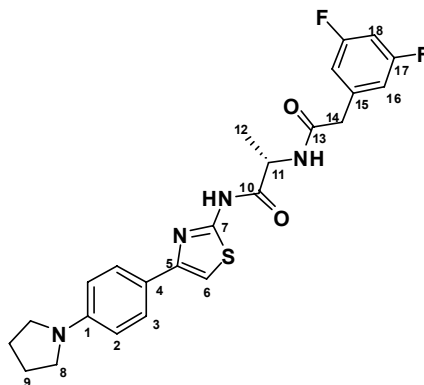
Nach AAV12 wird **212** (50 mg, 0.13 mmol) mit Trifluoressigsäure (90  $\mu$ l, 1.27 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 49 mg (quant.) von **213** als gelber Feststoff,  $R_F$  (EE/H 1:1) = 0.18, **HPLC** (Methode 1):  $t_r$  = 1.24 min (92%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.64 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2H, H-3), 6.98 (s, 1H, H-6), 6.82 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-2), 4.71 (s, 1H, H-11), 3.43-3.38 (m, 4H, H-8), 1.98-1.92 (m, 4H, H-9), 1.46 (s, 3H, H-12) ppm.

**(S)-2-(2-(3,5-Difluorphenyl)acetamid)-N-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)propanamid (92)**

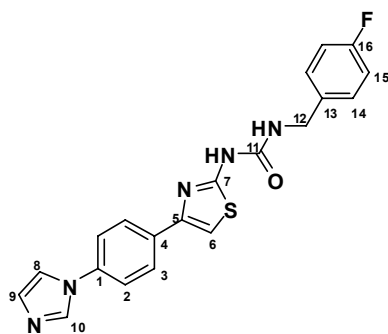
Nach AAV13 wird 3,5-Difluorphenyllessigsäure (186 mg, 1.08 mmol) mit **94** (400 mg, 0.98 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 322 mg (74%) von **92** als gelber Feststoff,  $R_F$  (EE/H 1:1) = 0.56, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.50 min (90%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{MeOD}$ ):**  $\delta$  = 8.20 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, H-2), 8.07 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-3), 7.70 (s, 1H, H-6), 6.90-6.80 (m, 3H, H-14/-18), 4.49 (s, 1H, H-9), 3.17 (s, 2H, H-12), 1.36 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, H-10) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeOD}$ ):**  $\delta$  = 173.8 (C-8), 172.4 (C-11), 165.7 (C-7), 160.5 (C-15), 149.3 (C-5), 148.9 (C-1), 142.5 (C-4), 140.7 (C-13), 128.4 (C-3), 125.8 (C-2), 114.5 (C-14), 104.2 (C-6), 101.4 (C-16), 51.1 (C-9), 43.2 (C-12), 18.7 (C-10) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 469 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

**(S)-N-(4-(4-Aminophenyl)thiazol-2-yl)-2-(2-(3,5-difluorophenyl)acetamid)propanamid (32)**

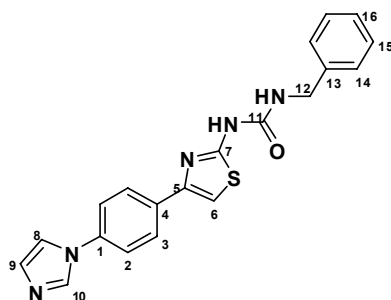
Nach AAV4 wird **92** (150 mg, 0.34 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 139 mg (98%) von **32** als gelber Feststoff,  $R_F$  (EE/H 1:1) = 0.54, HPLC (Methode 4):  $t_r$  = 2.93 min (94%).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD):  $\delta$  = 7.54 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, H-2), 7.70 (s, 1H, H-6), 6.68-6.54 (m, 5H, H-2/-14/-16), 4.53 (s, 1H, H-9), 3.37 (s, 2H, H-12), 1.47 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, H-10) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 439 ( $M+\text{Na}$ ) $^+$ .

**(S)-2-(2-(3,5-Difluorophenyl)acetamid)-N-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-propanamid (109)**

Nach AAV13 wird 3,5-Difluorphenylessigsäure (160 mg, 0.93 mmol) mit **213** (360 mg, 0.84 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 190 mg (48%) von **109** als braunen Feststoff,  $R_F$  (EE/H 1:1) = 0.54, HPLC (Methode 1):  $t_r$  = 7.89 min (95%).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.68 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-3), 7.26 (s, 1H, H-6), 6.89 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-3), 6.581-6.551 (m, 3H, H-16/-18), 5.20 (s, br, 2H, NH), 4.48 (s, 1H, H-11), 3.33-3.28 (m, 6H, H-8/-14), 2.03-1.98 (m, 4H, H-9), 1.37 (s, 3H, H-12) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 173.8 (C-10), 172.4 (C-13), 166.8 (C-7), 163.5 (C-17), 150.7 (C-5), 147.8 (C-1), 138.4 (C-15), 127.2 (C-3), 122.4 (C-4), 112.7 (C-2), 105.7 (C-16), 104.2 (C-6), 101.4 (C-16), 50.5 (C-11), 47.6 (C-8), 42.9 (C-14), 25.5 (C-9), 17.9 (C-12) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 514 ( $M+2\text{Na}$ ) $^+$ .

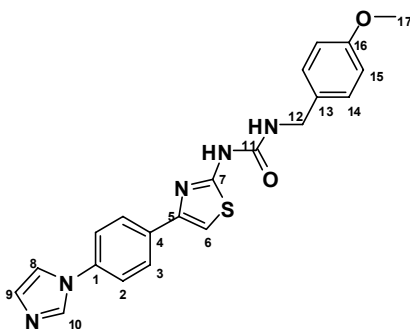
**1-(4-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-3-(4-fluorbenzyl)harnstoff (99)**


Nach AAV14 wird 1-Fluor-4-(isocyanatmethyl)benzol (15 mg, 0.10 mmol) mit Thiazolylamin ?? (35 mg, 0.11 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 18 mg (46%) von **99** als farbloser Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.50, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.45 min (95%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 8.22 (s, br, 1H, NH), 7.93 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-3), 7.62 (s, 1H, H-6), 7.51 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2), 7.36-7.31 (m, 3H, H-15/-8), 7.21-7.16 (m, 3H, H-8/-9/-10), 7.06-6.95 (m, 2H, H-14), 4.66 (s, 2H, H-12) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 394 (M+H)<sup>+</sup>.

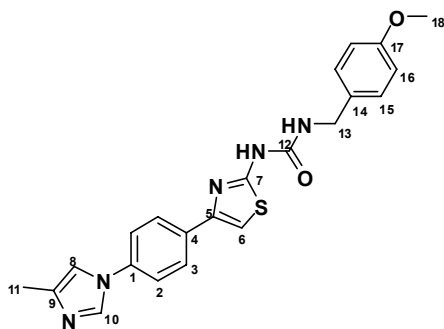
**1-(4-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-3-benzylharnstoff (110)**


Nach AAV14 wird (Isocyanatmethyl)benzol (18 mg, 0.13 mmol) mit Thiazolylamin **209** (45 mg, 0.14 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 28 mg (57%) von **110** als farbloser Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.51, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.48 min (93%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 8.42 (s, br, 1H, NH), 7.79 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-3), 7.61 (s, 1H, H-6), 7.51 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H, H-2), 7.46-7.33 (m, 3H, H-15/-8), 7.26-7.15 (m, 5H, H-9/-10/-14/-16), 4.36 (s, 2H, H-12) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 376 (M+H)<sup>+</sup>.



**1-(4-(4-(1*H*-Imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)harnstoff (111, BSc3871)**

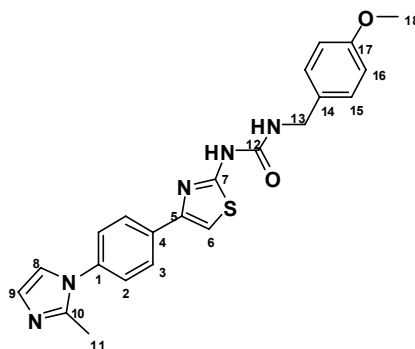
Nach AAV14 wird 1-Isocyanatmethyl-4-methoxybenzol (16 mg, 0.10 mmol) mit Thiazolylamin **209** (35 mg, 0.11 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 18 mg (44%) von **111** als farbloser Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 0.50, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.45 min (95%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 7.81 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-3), 7.69 (s, 1H, H-6), 7.62 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2), 7.46-7.38 (m, 3H, H-14/-8), 7.25-7.15 (m, 4H, H-9/-10/-15), 6.02 (s, br, 1H, NH), 4.64 (s, 2H, H-12), 3.68 (s, 3H, H-17) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 406 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(4-(4-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)harnstoff (113, BSc3862)**

Nach AAV14 wird 1-Isocyanatmethyl-4-methoxybenzol (27 mg, 0.17 mmol) mit Thiazolylamin **211** (64 mg, 0.19 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 48 mg (67%) von **113** als farbloser Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 0.52, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.99 min (95%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.81 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, H-3), 7.43 (s, 1H, H-6), 7.36 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, H-3), 7.25 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-15), 7.06 (s, 2H, H-8/-10), 6.86 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-16), 4.48 (s, breit, 2H, NH), 4.37 (s, 2H, H-13), 3.76 (s, 3H, H-18), 2.23 (s, 3H, H-11) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 165.1 (C-7), 162.9 (C-17), 158.4

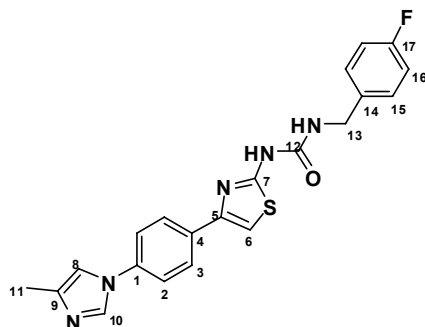
(C-12), 152.1 (C-5), 142.7 (C-9), 140.3 (C-1), 138.2 (C-10), 137.6 (C-4), 134.4 (C-14), 132.7 (C-15), 131.2 (C-3), 124.9 (C-2), 118.6 (C-8), 117.9 (C-16), 110.6 (C-6), 59.0 (C-18), 47.2 (C-13), 16.7 (C-11) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 420$  (M+H)<sup>+</sup>.

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(4-(4-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)harnstoff  
(114, BSc3863)**



Nach AAV14 wird 1-Isocyanatmethyl-4-methoxybenzol (26 mg, 0.17 mmol) mit Thiazolylamin **210** (64 mg, 0.19 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 36 mg (51%) von **114** als farbloser Feststoff,  $R_F$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.52, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 5.01$  min (97%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7.79$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-3), 7.42 (s, 1H, H-6), 7.37 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-3), 7.25-7.21 (m, 3H, H-8/-15), 7.04 (s, 1H, H-9), 6.87 (d,  $J = 9.08$  Hz, 2H, H-16), 5.80 (s, breit, 2H, NH), 4.34 (s, 2H, H-13), 3.64 (s, 3H, H-18), 2.52 (s, 3H, H-11) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 164.2$  (C-7), 158.8 (C-17), 156.4 (C-12), 150.2 (C-5), 145.3 (C-10), 138.2 (C-1), 132.1 (C-4), 130.5 (C-15), 130.2 (C-14/-9), 128.4 (C-3), 118.2 (C-8), 114.2 (C-2/-C-16), 105.0 (C-6), 55.8 (C-18), 44.4 (C-13), 14.8 (C-11) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 420$  (M+H)<sup>+</sup>.

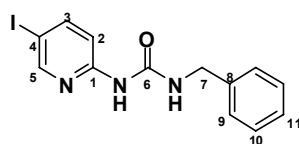
**1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)harnstoff (112, BSc3864)**



Nach AAV14 wird 1-Fluor-4-(isocyanatmethyl)benzol (26 mg, 0.17 mmol) mit Thiazolylamin **211** (64 mg, 0.19 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 34 mg (49%) von **112** als farbloser Feststoff,  $R_F$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) = 0.48, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.68 min (92%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.84 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, H-3), 7.68 (s, 1H, H-6), 7.61 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, H-3), 7.46-7.39 (m, 3H, H-8/-15), 7.15-7.12 (m, 3H, H-10/-16), 6.02 (s, breit, 2H, NH), 4.28 (s, 2H, H-13), 2.25 (s, 3H, H-11) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 164.4 (C-7), 160.9 (C-17), 158.4 (C-12), 152.1 (C-5), 142.7 (C-9), 140.3 (C-1), 134.6 (C-10), 133.5 (C-14), 132.4 (C-4), 128.5 (C-3/-15), 115.4 (C-16), 114.8 (C-2/-8), 106.6 (C-6), 44.8 (C-13), 14.8 (C-11) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 420 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

### 5.3.3 Synthese der Pyridinylharnstoffe

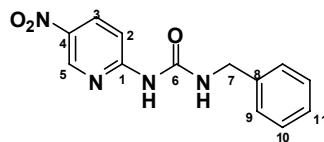
**1-Benzyl-3-(5-iodopyridin-2-yl)harnstoff (178, BSc3800)**



Nach AAV15 2-Amino-5-iodopyridin (165 mg, 0.80 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 100 mg (38%) von **178** als cremefarbener Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.73 min (99%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}$ ):**  $\delta$  = 9.35 (breit, s, 2H, NH), 8.37 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.98 (dd,  $J$  = 2.3 Hz,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-3), 7.42 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-10), 7.35-7.29 (m, 4H, H-9/-10), 7.24 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, H-11), 4.37 (s, 2H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO}$ ):**  $\delta$  = 154.5 (C-6), 152.5 (C-1), 152.4

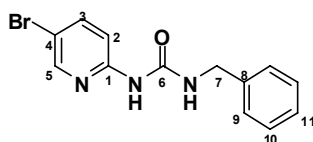
(C-5), 146.7 (C-3), 139.8 (C-8), 128.3 (C-10), 127.0 (C-9), 126.8 (C-11), 113.9 (C-2), 82.7 (C-4), 42.6 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 353$  (M+H)<sup>+</sup>. **Schmelzpunkt:** 193.0 °C.

### 1-Benzyl-3-(5-nitropyridin-2-yl)harnstoff (179, BSc3816)

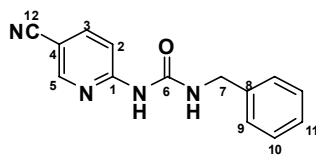


Nach AAV15 werden 2-Amino-5-nitropyridin (104 mg, 0.8 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 125 mg (61%) von **179** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 5.14$  min (98%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 0.02$  (s, 1H, NH), 9.06 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-5), 8.48 (dd,  $J = 9.3$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-3), 7.79 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H, H-10), 8.03 (s, 1H, NH), 7.36-7.31 (m, 4H, H-9/-10), 7.26 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-11), 4.40 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, H-7) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 157.3$  (C-6), 153.8 (C-1), 144.7 (C-5), 139.4 (C-8), 138.4 (C-4), 133.8 (C-3), 128.4 (C-10), 127.1 (C-9), 126.9 (C-11), 110.8 (C-2), 42.8 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 272$  (M)<sup>+</sup>. **Schmelzpunkt:** 202.9 °C.

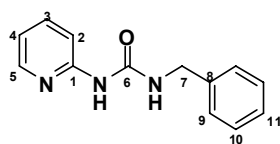
### 1-Benzyl-3-(5-bromopyridin-2-yl)harnstoff (180, BSc3817)



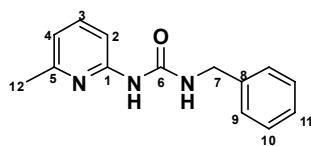
Nach AAV15 werden 2-Amino-5-bromopyridin (130 mg, 0.8 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 138 mg (60%) von **180** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 5.22$  min (100%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.36$  (s, 1H, NH), 8.28 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-5), 7.99 (s, 1H, NH), 7.88 (dd,  $J = 8.9$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-3), 7.54 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-10), 7.35-7.29 (m, 4H, H-9/-10), 7.24 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-11), 4.38 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, H-7) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 154.4$  (C-6), 152.3 (C-1), 147.4 (C-5), 140.5 (C-3), 139.7 (C-8), 128.4 (C-10), 127.0 (C-9), 126.8 (C-11), 113.4 (C-2), 110.9 (C-4), 42.6 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 307$  (M)<sup>+</sup>. **Schmelzpunkt:** 178.4 °C.

**1-Benzyl-3-(5-cyanopyridin-2-yl)harnstoff (181, BSc3818)**

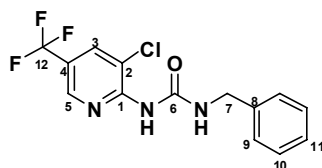
Nach AAV15 werden 2-Amino-5-cyanopyridin (165 mg, 0.8 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 10 mg (5%) von **181** als brauner Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.52$  min (44%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.75$  (s, 1H, NH), 9.21 (s, breit, 1H, NH), 8.36 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-5), 7.72 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-3), 7.35-7.24 (m, 5H, H-9/-10/-11), 7.02 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-2), 4.58 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 155.7$  (C-6), 151.0 (C-1), 140.7 (C-5), 139.1 (C-8), 128.8 (C-10), 127.6 (C-9), 127.5 (C11), 117.1 (C-12), 112.4 (C-2), 102.1 (C-3), 99.8 (C-4), 44.8 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 252$  (M)<sup>+</sup>. **Schmelzpunkt:** 151.7 °C.

**1-Benzyl-3-(pyridin-2-yl)harnstoff (182, BSc3819)**

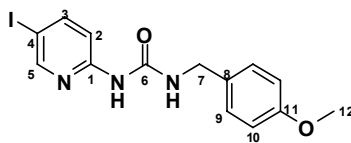
Nach AAV15 werden 2-Aminopyridin (71 mg, 0.8 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 130 mg (76%) von **182** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.71$  min (97%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.28$  (s, 1H, NH), 8.62 (breit, s, 1H, NH), 8.16 (dd,  $J = 5.0$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H-5), 7.69-7.65 (m, 1H, H-3), 7.37-7.30 (m, 5H, H-9/-10/-11), 7.23 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-2), 6.93-6.90 (m, 1H, H-4), 4.41 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 154.9$  (C-6), 153.4 (C-1), 146.7 (C-5), 140.0 (C-3), 138.2 (C-8), 128.3 (C-10), 127.0 (C-9), 126.7 (C-11), 116.8 (C-4), 111.6 (C-2), 42.6 4 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 227$  (M)<sup>+</sup>. **Schmelzpunkt:** 159.7 °C.

**1-Benzyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)harnstoff (183, BSc3820)**

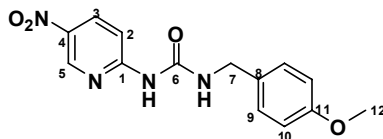
Nach AAV15 werden 2-Amino-6-methylpyridin (81 mg, 0.8 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 148 mg (82%) von **183** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.55$  min (91%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.25$  (s, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, NH), 7.55 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-3), 7.36/7.31 (m, 4H, H-9/-10), 7.25 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H, H-11), 7.14 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-2), 6.77 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-4), 4.40 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, H-7), 2.33 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 155.1$  (C-6), 154.9 (C-1), 152.8 (C-5), 139.8 (C-3), 138.5 (C-8), 128.4 (C-10), 127.0 (C-9), 126.8 (C-11), 115.8 (C-4), 108.4 (C-2), 42.7 (C-7), 23.6 (C-12) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 241$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 173.6 °C.

**1-Benzyl-3-(3-chlor-5-(trifluormethyl)pyridin-2-yl)harnstoff (184, BSc3821)**

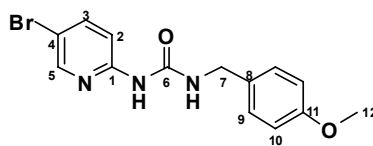
Nach AAV15 werden 2-Amino-3-chlor-5-trifluormethylpyridin (147 mg, 0.8 mmol) und Benzylisocyanat (100 mg, 0.8 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 63 mg (26%) von **184** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.48$  min (33%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 8.24$  (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H-5), 7.32-7.29 (m, 2H, H-10), 7.27-7.20 (m, 3H, H-9/-11), 7.12 (s, 1H, NH), 6.42 (s, 1H, H-3), 4.23 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H, H-8) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 158.1$  (C-6), 154.9 (C-1), 144.0 (C-5), 140.9 (C-3), 133.4 (C-8), 128.2 (C-10), 127.0 (C-9), 126.5 (C-11), 123.4 (C-12), 113.7 (C-4), 112.9 (C-2), 43.0 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 329$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 122.7 °C.

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(5-iodopyridin-2-yl)harnstoff (185, BSc3856)**

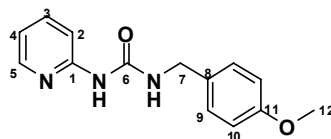
Nach AAV15 werden 2-Amino-5-iodopyridin (135 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 30 mg (13%) von **185** als weiße Nadeln, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.76$  min (100%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.35$  (breit, s, 1H, NH), 9.15 (breit, s, 1H, NH), 8.29 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-5), 7.77 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-3), 7.29-7.24 (m, 2H, H-9), 6.87 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-10), 6.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-2), 4.52 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H-7), 3.80 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 158.2$  (C-6), 156.1 (C-1), 154.3 (C-11), 152.0 (C-5), 146.1 (C-3), 128.8 (C-9), 127.5 (C-8), 113.7 (C-10), 112.9 (C-2), 81.9 (C-4), 55.4 (C-12), 43.4 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 383$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 146.6 °C.

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(5-nitropyridin-2-yl)harnstoff (186, BSc3857)**

Nach AAV15 werden 2-Amino-5-nitropyridin (85 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 50 mg (27%) von **186** als weiße Nadeln, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.57$  min (75%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 10.37$  (breit, s, 1H, NH), 9.47 (breit, s, 1H, NH), 8.96 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-5), 8.25 (dd,  $J = 9.1$  Hz,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-3), 7.23 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-9), 6.91 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-2), 6.82 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-10), 4.49 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H-7), 3.73 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 159.1.2$  (C-6), 157.2 (C-11), 155.7 (C-1), 144.1 (C-5), 144.1 (C-4), 138.8 (C-3), 133.5 (C-9), 128.9 (C-8), 114.2 (C-10), 112.1 (C-2), 55.5 (C-12), 43.7 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 302$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 182.8 °C.

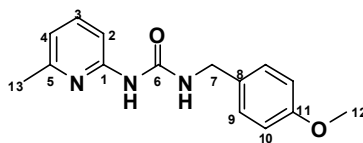
**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(5-brompyridin-2-yl)harnstoff (187, BSc3858)**

Nach AAV15 werden 2-Amino-5-brompyridin (106 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 144 mg (70%) von **187** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.11$  min (98%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.33$  (breit, s, 1H, NH), 8.96 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-5), 7.90 (breit, s, 1H, NH), 7.88 (dd,  $J = 8.9$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-3), 7.54 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-2), 7.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-9), 6.89 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-10), 4.2 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H, H-7), 3.72 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 158.3$  (C-11), 154.4 (C-6), 152.3 (C-1), 147.5 (C-5), 140.5 (C-3), 128.9 (C-9), 128.5 (C-8), 113.8 (C-10), 113.4 (C-2), 110.9 (C-4), 55.1 (C-12), 42.1 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 337$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 145.4 °C.

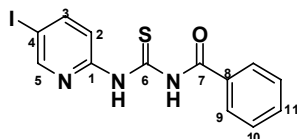
**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(pyridin-2-yl)harnstoff (188, BSc3826)**

Nach AAV15 werden 2-Aminopyridin (57 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 63 mg (40%) von **188** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.31$  min (85%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.24$  (s, 1H, NH), 8.52 (s, 1H, NH), 8.15 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-5), 7.67 (t,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-3), 7.36 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-9), 7.23 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-2), 7.17 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-4), 6.92-6.86 (m, 2H, H-10), 4.15 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, H-7), 3.70 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 158.2$  (C-11), 154.8 (C-6), 153.4 (C-1), 146.7 (C-5), 138.2 (C-3), 132.8 (C-4), 128.4 (C-9), 128.3 (C-8), 113.8 (C-10), 111.6 (C-2), 55.0 (C-12), 42.0 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 257$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 140.3 °C

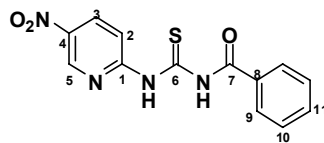


**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)harnstoff (189, BSc3827)**

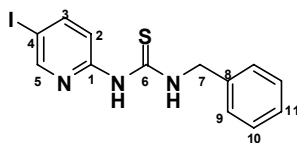
Nach AAV15 werden 2-Amino-6-methylpyridin (66 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 160 mg (96%) von **189** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 3.74$  min (91%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.37$  (s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, NH), 7.72 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-3), 7.42 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-9), 7.35-7.30 (m, 1H, H-2), 7.08 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-10), 6.95 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-4), 4.49 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H-7), 3.91 (s, 3H, H-12), 3.54 (s, 3H, H-13) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 158.2$  (C-11), 155.1 (C-6), 154.8 (C-1), 152.9 (C-5), 138.5 (C-3), 131.8 (C-8), 128.4 (C-9), 115.8 (C-10), 113.8 (C-4), 108.4 (C-2), 55.1 (C-12), 42.2 (C-7), 23.7 (C-13) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 271$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 130.9 °C.

**5.3.4 Synthese der Pyridinylthioharnstoffe****1-Benzoyl-3-(5-iodopyridin-2-yl)thioharnstoff (200, BSc3798)**

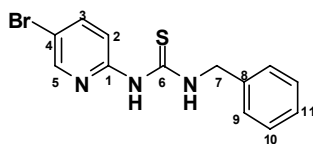
Nach AAV16 werden 2-Amino-5-iodopyridin (135 mg, 0.6 mmol) und Benzoylisothiocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 180 mg (77%) von **200** als gelber Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 7.76$  min (96%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 13.12$  (breit, s, 1H, NH), 9.06 (breit, s, 1H, NH), 8.72 (s, 1H, H-5), 8.63 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-3), 8.04 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-11), 7.91 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-9), 7.66 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-2), 7.55 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-10) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 177.0$  (C-6), 166.4 (C-7), 154.4 (C-5), 154.4 (C-1), 150.5 (C-3), 145.7 (C-8), 133.8 (C-4), 131.5 (C-11), 129.2 (C-10), 127.5 (C-9), 117.5 (C-2) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 383$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 188.9 °C.

**1-Benzoyl-3-(5-nitropyridin-2-yl)thioharnstoff (201, BSc3799)**

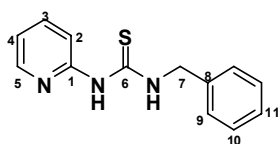
Nach AAV16 werden 2-Amino-5-nitropyridin (139 mg, 0.6 mmol) und Benzoylisothiocyanat (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 80 mg (44%) von **201** als gelber Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.33$  min (93%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 13.37$  (breit, s, 1H, NH), 12.45 (breit, s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, H-5), 8.71 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-3), 7.99 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-9), 7.69-7.59 (m, 3H, H-10/11), 7.57 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-2) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 178.4$  (C-6), 168.1 (C-7), 155.1 (C-1), 144.6 (C-5), 140.8 (C-4), 134.3 (C-3), 133.4 (C-8), 132.1 (C-11), 128.6 (C-10), 128.6 (C-9), 114.0 (C-2) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 302$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 191.1 °C.

**1-Benzyl-3-(5-iodopyridin-2-yl)thioharnstoff (190, BSc3855)**

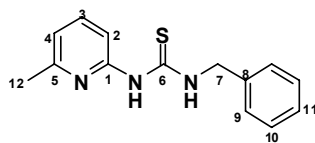
Nach AAV16 werden 2-Amino-5-iodopyridin (148 mg, 0.7 mmol) und Benzylisothiocyanat (100 mg, 0.7 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 23 mg (10%) von **190** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.61$  min (97%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 11.63$  (s, 1H, NH), 8.83 (s, 1H, NH), 8.30 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-5), 7.87 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-3), 7.39-7.29 (m, 5H, H-9/-10/-11), 6.65 (d,  $^3J = 8.7$  Hz, 1H, H-2), 4.98 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 190.4$  (C-6), 154.2 (C-5), 151.9 (C-1), 146.8 (C-3), 137.2 (C-8), 128.9 (C-9), 127.8 (C-10), 127.71 (C-11), 114.0 (C-2), 92.0 (C-4), 49.9 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 369$  (M) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 205.3 °C.

**1-Benzyl-3-(5-bromopyridin-2-yl)thioharnstoff (191, BSc3822)**

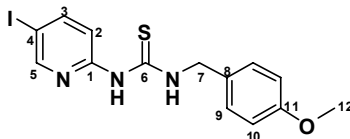
Nach AAV16 werden 2-Amino-5-brompyridin (115 mg, 0.7 mmol) und Benzylisothiocycant (100 mg, 0.7 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 15 mg (7%) von **191** als weiße Nadeln, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 3.99 min (96%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 11.60 (s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, NH), 8.16 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.72 (dd,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, H-3), 7.40-7.29 (m, 5H, H-9/-10/-11), 6.73 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-2), 4.98 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 180.0 (C-6), 152.6 (C-5), 151.8, (C-1), 146.9 (C-3), 141.6 (C-8), 137.3 (C-4), 128.9 (C-9), 127.8 (C-10), 127.7(C-11), 113.5 (C-2), 49.9 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 323 (M+H) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 183.6 °C.

**1-Benzyl-3-(pyridin-2-yl)thioharnstoff (192, BSc3823)**

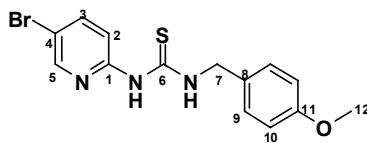
Nach AAV16 werden 2-Aminopyridin (63 mg, 0.7 mmol) und Benzylisothiocycant (100 mg, 0.7 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 47 mg (29%) von **192** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r$  = 4.01 min (100%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 12.08 (s, 1H, NH), 10.7 (s, 1H, NH), 8.17 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H, H-5), 7.77 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H-3), 7.37-7.33 (m, 4H, H-9/-10), 7.27 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, H-11), 7.19 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, H-2), 7.02 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, H-4), 4.92 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, H-7) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125, MHz DMSO):**  $\delta$  = 180.1 (C-6), 153.7 (C-5), 151.8, (C-1), 139.0 (C-3), 138.3 (C-8), 128.4 (C-10), 127.2 (C-9), 127.0(C-11), 117.8 (C-4), 112.6 (C-2), 47.8 (C-7) ppm. **Schmelzpunkt:** 163.0 °C.

**1-Benzyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)thioharnstoff (193, BSc3824)**

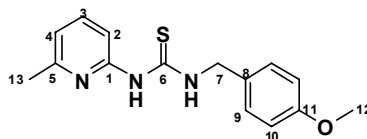
Nach AAV16 werden 2-Amino-6-methylpyridin (72 mg, 0.7 mmol) und Benzylisothiocyant (100 mg, 0.7 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 78 mg (45%) von **193** als farbloser Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.16$  min (81%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 12.30$  (s, 1H, NH), 10.62 (s, 1H, NH), 7.64 (d  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-3), 7.42-7.37 (m, 4H, H-9/-10), 7.30 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-11), 6.97 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-4), 6.87 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-2), 4.85 (d,  $J = 5.1$  Hz, 2H, H-7), 2.27 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 179.7$  (C-6), 154.3 (C-5), 153.3 (C-1), 139.2 (C-3), 137.9 (C-8), 128.5 (C-10), 127.4 (C-9), 127.2 (C-11), 116.9 (C-4), 109.4 (C-2), 48.2 (C-7), 23.3 (C-12) ppm. **Schmelzpunkt:** 126.0 °C.

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(5-iodopyridin-2-yl)thioharnstoff (194, BSc3860)**

Nach AAV16 werden 2-Amino-5-iodopyridin (148 mg, 0.7 mmol) und 4-Methoxybenzylisothiocyant (100 mg, 0.7 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 12 mg (4%) **194** als oranger Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.14$  min (98%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 11.42$  (s, 1H, NH), 8.45 (s, 1H, NH), 8.22 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-5), 7.79 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-3), 7.24 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-9), 6.82 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-2), 6.51 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-10), 4.81 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, H-7), 3.74 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 179.8$  (C-6), 159.5 (C-11), 152.4 (C-5), 152.3 (C-1), 147.0 (C-3), 129.6 (C-11), 129.5 (C-9), 114.6 (C-10), 114.2 (C-2), 83.5 (C-4), 55.7 (C-12), 49.7 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 399$  (M)<sup>+</sup>.

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(5-bromopyridin-2-yl)thioharnstoff (195, BSc3859)**

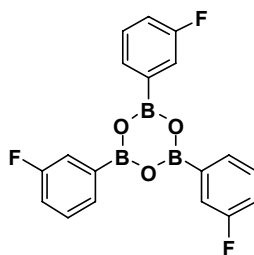
Nach AAV16 werden 2-Amino-5-bromopyridin (97 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisothiocycant (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 25 mg (12%) **195** als weiße Nadeln, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.06$  min (99%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 8.46$  (s, 1H, NH), 8.16 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H-5), 7.72 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-3), 7.32 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-9), 6.90 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-10), 6.65 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-2), 4.89 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, H-7), 3.81 (s, 3H, H-12) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 179.6$  (C-6), 159.5 (C-11), 159.3 (C-5), 151.7 (C-1), 147.0 (C-3), 141.6 (C-8), 129.2 (C-9), 114.3 (C-10), 113.4 (C-2), 113.0 (C-4), 55.5 (C-12), 49.5 (C-7) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 353$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**1-(4-Methoxybenzyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)thioharnstoff (196, BSc3825)**

Nach AAV16 werden 2-Amino-6-methylpyridin (60 mg, 0.6 mmol) und 4-Methoxybenzylisothiocycant (100 mg, 0.6 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 70 mg (44%) von **196** als gelber Feststoff, **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 4.21$  min (93%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 12.23$  (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, NH), 7.64 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H-3), 7.25 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-9), 6.97-6.85 (m, 4H, H-2/-4/-10), 4.62 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H-7), 3.82 (s, 3H, H-12), 2.43 (s, 3H, H-13) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO):**  $\delta = 179.4$  (C-6), 158.5 (C-11), 154.2 (C-5), 153.3 (C-1), 139.2 (C-3), 129.8 (C-8), 128.8 (C-9), 116.8 (C-10), 113.9 (C-4), 109.3 (C-2), 55.1 (C-12), 47.7 (C-7), 23.3 (C-13) ppm. **MS (EI):**  $m/z = 287$  ( $\text{M}$ ) $^+$ . **Schmelzpunkt:** 171.4 °C.

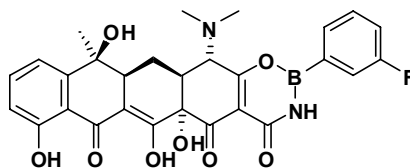
### 5.3.5 Synthese der Aggregationsinhibitoren

#### 2,4,6-Tris(4-fluorphenyl)-1,3,5,2,4,6-trioxatriborinane (**214**)



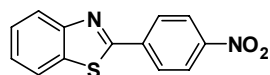
3-Fluorphenylboronsäure (200 mg, 1.43 mmol) wird in Toluol gelöst (10 mL) und 3 h am Rückfluss erhitzt. Der erhaltende Feststoff wird aus Toluol umkristallisiert. Ausbeute: 70 mg (40%) von **214** als brauner Feststoff. Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.<sup>[290]</sup>

#### (5a*S*,12*S*,12a*S*,13a*S*,14*S*)-14-(Dimethylamino)-2-(3-fluorphenyl)-5a,6,8,12-tetra-hydroxy-12-methyl-12a,13,13a,14-tetrahydro-2*H*-tetracen[2,3-*e*][1,3,2]oxazaborinin-4,5,7-(3*H*,5a*H*,12*H*)-trion (**154**)



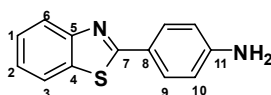
Tetracyclin (299 mg, 0.67 mmol) und 3-Fluorphenylboronsäureanhydrid **214** (70 mg, 0.22 mmol) werden in absol. Toluol (20 mL) gelöst und unter kontinuierlicher Wasserabscheidung 2 h am Rückfluss erhitzt. Nach Einengung und Abkühlung wird der ausgefallene Niederschlag filtriert, mit kaltem Toluol gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 323 mg (88%) von **154** als gelber Feststoff. **HPLC** (Methode 4):  $t_r = 2.88$  min (92%).

Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.<sup>[275]</sup>

**2-(4-Nitrophenyl)benz[d]thiazol (161)**

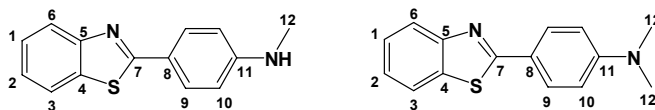
4-Nitrobenzoylchlorid (2.80 g, 15.00 mmol) wird unter Eiskühlung portionsweise zu einer Lösung von 2-Aminobenzthiol (1.6 mL, 15.00 mmol) in NMP (15 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 100 °C für 1 h gerührt, auf RT abgekühlt, in Eiswasser gegeben und mit einer wässrigen Ammoniak-Lsg. auf pH 8-9 gebracht. Es fällt ein gelber Feststoff aus, der filtriert, mit kaltem MeOH gewaschen und an Luft getrocknet wird. Ausbeute: 3.64 g (95%) von **161** als gelber Feststoff.

Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.<sup>[291]</sup>

**4-(Benz[d]thiazol-2-yl)anilin (162)**

2-(4-Nitrophenyl)benz[d]thiazol **161** (1.00 g, 3.90 mmol) wird in EtOH (10 mL) suspendiert, mit Zinnchlorid (3.7 g, 19.50 mmol) versetzt und 2 h am Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und mit NaOH-Lsg. (2N, 3x 20 mL), dest. H<sub>2</sub>O (2x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 802 mg (91%) von **162** als gelber Feststoff. **HPLC** (Methode 1): 6.58 min (96%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 8.01 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, H-6), 7.89 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-3), 7.79 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, H-9), 7.46 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, H-1), 7.35 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, H-2), 6.69 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, H-10), 5.92 (s, 1H, NH) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 168.1 (C-7), 153.8 (C-5), 152.1 (C-11), 133.6 (C-4), 126.1 (C-9), 124.2 (C-1/-2), 121.7 (C-3/-6), 120.0 (C-8), 113.5 (C-10) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 226 (M)<sup>+</sup>.

#### 4-(Benz[*d*]thiazol-2-yl)-*N*-methylanilin (**215**) und 4-(Benz[*d*]thiazol-2-yl)-*N,N*-dimethylanilin (**216**)

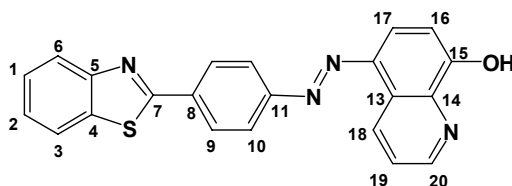


4-(Benz[*d*]thiazol-2-yl)anilin (200 mg, 0.88 mmol) und Kaliumcarbonat (146 mg, 1.86 mmol) werden in DMF (5 mL) gelöst. Anschließend wird Methyljodid (116  $\mu$ L, 1.86 mmol) langsam zutropft. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei 80 °C erhitzt. Nach Abkühlung und Zugabe von dest. Wasser (25 mL) erfolgt die Extraktion mit Ethylacetat (3x 25 mL). Die organischen Phasen werden mit Wasser (3x 25 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Produkte werden durch LC gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Ausbeute: 54 mg (26%) von **215** als gelber Feststoff und 85 mg (38%) von **216** als gelber Feststoff.

**215:**  $R_f$ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 0.58, HPLC (Methode 4): 4.04 min (96%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 8.19 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, H-6), 8.00 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-3), 7.99 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-9), 7.63 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H-2), 7.52 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1H, H-1), 6.84 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-10), 4.87 (s, 1H, NH), 2.93 (s, 3H, H-12) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 168.4 (C-7), 154.19 (C-5), 152.79 (C-11), 134.0 (C-4), 129.1 (C-9), 126.9 (C-1), 124.8 (C-2), 122.7 (C-6, C-3), 120.4 (C-8), 112.2 (C-10), 29.67 (C-12) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 240 (M)<sup>+</sup>.

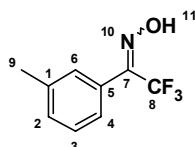
**216:**  $R_f$ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 0.85, HPLC (Methode 4): 4.69 min (95%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 7.97 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-6), 7.96 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, H-3), 7.76 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H-9), 7.39 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-2), 7.26 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-1), 6.71 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H, H-10), 3.00 (s, 6H, H-12) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 168.4 (C-7), 154.19 (C-5), 152.79 (C-11), 134.0 (C-4), 131.1 (C-9), 128.3 (C-1), 126.5 (C-2), 123.4 (C-6, C-3), 123.0 (C-8), 113.9 (C-10), 42.3 (C-12) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 254 (M)<sup>+</sup>.



7-((4-(Benz[d]thiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)chinolin-8-ol (**158**)

4-(Benz[d]thiazol-2-yl)anilin (200 mg, 0.88 mmol) und Eis (2 g) werden zu einer  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung (160  $\mu\text{L}$  in 1 mL Wasser) bei 0 °C gegeben. Eine eiskalte Lösung von  $\text{NaNO}_2$  (66 mg, 0.88 mmol) in Wasser (0.5 mL) wird tropfenweise zugegeben. Dabei wird die Temperatur unter 5 °C gehalten und der pH-Wert mit verd.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 3 eingestellt. 8-Hydroxychinolin (116 mg, 0.8 mmol) wird in  $\text{NaOH}$ -Lösung (1N, 3.2 mL) gegeben. Unter starkem Rühren wird dann die Diazoniumsalzlösung zugegeben. Es bildet sich ein roter Niederschlag, der filtriert, getrocknet und aus MeOH umkristallisiert wird. Ausbeute: 256 mg (76%) von **158** als roten Feststoff,  $R_f(\text{EE}) = 0.47$ , HPLC (Methode 4): 3.58 min (95%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta = 9.28$  (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-17, H-20), 8.94 (s, 1H, H-18), 8.25 (d,  $J = 6.58$  Hz, 1H, H-6), 8.12–8.00 (m, 6H, H-3/-6/-9/-10), 7.74 (dd,  $J = 12.6$  Hz, 1H, H-19), 7.50 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-2), 7.44 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-1), 7.20 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-16) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO):**  $\delta = 168.4$  (C-7), 156.1 (C-15), 155.7 (C-7), 154.6 (C-20), 151.2 (C-11), 146.0 (C-8), 140.0 (C-12), 136.8 (C-14), 136.5 (C-19), 134.0 (C-14), 130.5 (C-9), 129.8 (C-10), 127.9 (C-3), 126.1 (C-6), 125.5 (C-1), 125.1 (C-2), 124.5 (C-17), 114.0 (C-16) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 383$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

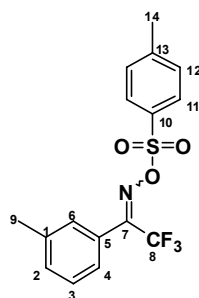
## 5.3.6 Synthese des Diazirin-Photolabels

2,2,2-Trifluor-1-*m*-tolylethanonoxim (**139**)

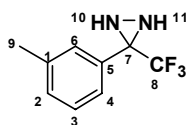
Eine Lösung von Trifluoracetophenon (2.00 g, 10.60 mmol) und Hydroxylamin-Hydrochlorid (745 mg, 10.60 mmol) in absol. EtOH (10 mL) und Pyridin (22 mL) wird bei 80 °C für 4 h erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt wird in Diethylether (70 mL) aufgenommen und mit dest. Wasser gewaschen (3x 30 mL). Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wird am

Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wird durch LC gereinigt (Hexan/EE 4:3). Ausbeute: 1.98 g (92%) von Substanz **139** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (Hexan/EE 4:3) = 0.58, **HPLC** (Methode 4): 3.61 min (98%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 9.00 (s, OH), 7.30-7.27 (m, 2H, H-4/-6), 7.23-7.18 (m, 2H, H-2/-3), 2.31 (d,  $J$  = 7.9, 3H, H-9) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 172.2 (C-7), 138.8 (C-1), 131.8 (C-5), 129.4 (C-2), 128.8 (C-6), 126.4 (C-3), 122.1 (C-4), 119.9 (C-8), 117.7 (C-8), 21.8 (C-9) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 203 ( $\text{M}^+$ ).

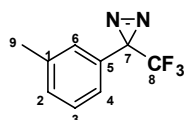
### 2,2,2-Trifluor-1-*m*-tolylethanon-*O*-tosyloxim (**140**)



4-Toluolsulfonsäurechlorid (937 mg, 4.93 mmol) wird portionsweise zu einer Lösung des Oxims **139** (1.0 g, 4.93 mmol), DIEA (943  $\mu\text{L}$ , 5.52 mmol) und DMAP (46 mg, 0.37 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) bei 0 °C gegeben. Nach 40 min wird die Eiskühlung entfernt und die Lösung 2 h bei RT gerührt. Es wird mit dest. Wasser (3x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung erfolgt durch LC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Petrolether 3:4). Ausbeute: 1.23 g (70%) von **140** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (Hexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20:1) = 0.84, **HPLC** (Methode 4): 3.34 min (100%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.83-7.80 (m, 2H, H-11), 7.32-7.09 (m, 6H, H-2/-3/-4/-6/-12), 2.40 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 3H, H-14), 2.31 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 3H, H-9) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 168.8 (C-7), 146.5 (C-10), 139.1 (C-13), 132.8 (C-1), 131.9 (C-5), 130.3 (C-2), 129.8 (C-12), 129.1 (C-6), 129.0 (C-3), 126.4 (C-11), 125.0 (C-4), 114.4 (C-8), 22.2 (C-14), 21.8 (C-9) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 357 ( $\text{M}^+$ ).

**3-*m*-Tolyl-3-(trifluormethyl)diaziridin (141)**

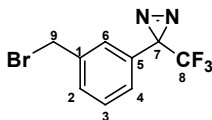
Zu einer Lösung von **140** (1.0 g, 2.80 mmol) in Diethylether (7 mL) wird bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Natrium destillierter, flüssiger Ammoniak (6 mL) gegeben. Das Reaktionsgefäß wird verschlossen und die Lösung wird im Dunklen 2 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Beim langsamen Erwärmen auf RT wird dem Ammoniak ermöglicht zu verdampfen. Die etherische Lösung wird filtriert und mit dest. Wasser (3x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (Hexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20:1. Ausbeute: 504 mg (89%) von **141** als farbloses Öl,  $R_f$  (Hexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20:1) = 0.71, **HPLC** (Methode 4): 4.21 min (82%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.34-7.26 (m, 2H, H-3/-6), 7.25-7.17 (m, 2H, H-2/-4), 2.69 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H, H-9), 2.14 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 132.8 (C-5), 131.3 (C-1), 130.3 (C-8), 129.7 (C-6), 129.1 (C-3), 126.9 (C-2), 125.6 (C-4), 80.8 (C-7), 21.8 (C-9) ppm. **MS (EI):**  $m/z$  = 203 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**3-*m*-Tolyl-3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin (142)**

Das Diaziridin **141** (300 mg, 1.48 mmol) wird im Dunklen in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) gelöst und Triethylamin (0.6 mL, 4.33 mmol) wird zugegeben. Diese Lösung wird auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Iod (413 mg, 1.63 mmol) wird portionsweise zugegeben, bis eine braune Farbe entsteht. Anschließend wird 2 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 1M NaOH-Lsg. (2x 25 mL), dest. Wasser (2x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (Hexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20:1). Ausbeute: 198 mg (67%) von **142** als farbloses Öl, das bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  als farbloser Feststoff auskristallisiert,  $R_f$  (EE) = 0.58, **HPLC** (Methode 1): 7.86 min (98%).  **$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.22-7.18 (m, 2H), 7.15 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 6.95 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 2.28 (s, 3H, H-9) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 139.2 (C-5), 130.8 (C-1), 129.5 (C-8), 129.1 (C-6), 127.4 (C-3), 124.0 (C-2),

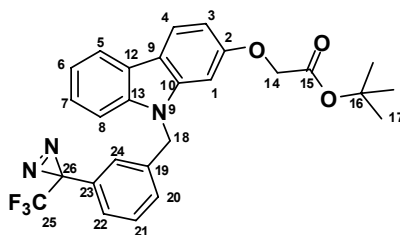
123.7 (C-4), 84.0 (C-7), 32.0 (C-8, CF), 23.0 (C-8, CF), 21.8 (C-9), 14.5 (C-8, CF) ppm. **MS** (**EI**):  $m/z = 200$  ( $M$ )<sup>+</sup>.

### 3-(3-(Brommethyl)phenyl)-3-(trifluormethyl)-3H-diazirin (**143**)



Eine Lösung des Diazirins **142** (100 mg, 0.50 mmol) in Tetrachlorkohlenstoff (4 mL) wird auf 70 °C erwärmt und NBS (80 mg, 0.45 mmol) wird hinzugeben. Nach 10 min wird AIBN (8 mg, 0.05 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung wird 2 h unter Rückfluss erhitzt. Der entstandene Niederschlag wird filtriert und das Lösungsmittel wird bei 20 °C vorsichtig am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt mittels LC (Hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20:1). Ausbeute: 73 mg (52%) von **143** als farbloses Öl, **R<sub>f</sub>**(Hexane/EE) = 0.5, **HPLC** (Methode 4): 4.71 min (79%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ = 7.40-7.31 (m, 2H, H-3/-6), 7.19-7.08 (m, 2H, H-2/-4), 4.38 (s, 2H, H-9) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ = 138.8 (C-5), 130.3 (C-1), 129.8 (C-8), 129.4 (C-6), 128.9 (C-3), 126.9 (C-2), 123.8 (C-4), 79.8 (C-7), 32.1 (C-9), 31.6 (C-8, CF), 22.6 (C-8, CF), 14.1 (C-8, CF) ppm.

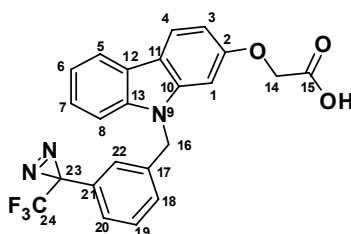
### *tert*-Butyl-2-(9-(3-(3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzyl)-9H-carbazol-2-yloxy)-acetat (**145**)



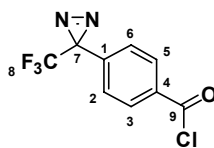
*tert*-Butyl-2-(9H-carbazol-2-yloxy)acetat (25 mg, 0.084 mmol) wird im Dunkeln bei 0 °C in THF (5 mL) gelöst und KO<sup>t</sup>-Bu (12 mg, 0.101 mmol) wird zugegeben. Nach 30 min wird das Diazirin **143** (35 mg, 0.126 mmol) zugegeben. Diese Reaktionsmischung wird langsam auf RT erwärmt und 12 h gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (20 mL) wird mit dest. Wasser (3x 15 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (Hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:4). Ausbeute: 18 mg (43%) von Substanz **145** als farbloser Feststoff, **R<sub>f</sub>**

(Hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:1) = 0.60, **HPLC** (Methode 4): 6.04 min (96%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 8.05-7.99 (m, 2H, H-4/-5), 7.37-7.35 (m, 1H, H-8), 7.27-7.24 (m, 3H, H-6/-7/-21), 7.09 (d,  $J$  = 4.02 Hz, 1H, H-24), 6.89 (m, 2H, H-20/22), 6.86 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H-3), 6.79 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, H-1), 5.44 (s, 2H, H-18), 4.58 (s, 2H, H-14), 1.45 (s, 9H, H-17) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 174.6 (C-15), 157.5 (C-2), 142.6 (C-13), 138.7 (C-23), 129.8 (C-12), 129.5 (C-19), 127.5 (C-25), 125.7 (C-4/24), 125.0 (C-21), 124.4 (C-22/-20), 123.2 (C-7/-10), 121.3 (C-5), 119.8 (C-6), 117.6 (C-11), 108.5 (C-8), 107.8 (C-3), 94.7 (C-1), 84.2 (C-26), 82.4 (C-16), 66.3. (C-14), 46.2 (C-18), 28.0 (C-17) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 495(M)<sup>+</sup>.

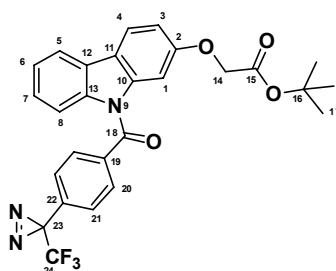
**2-(9-(3-(3-(Trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzyl)-9H-carbazol-2-yloxy)essigsäure (147, BSc3958)**



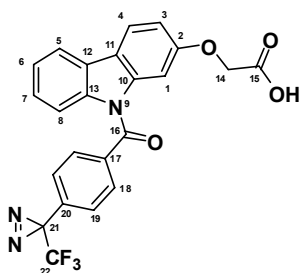
Der *tert*-Butylester **145** (12 mg, 0.024 mmol) wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (0.4 mL) wird hinzugegeben. Diese Lösung wird 6 h gerührt, anschließend filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (Hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:4). Ausbeute: 8 mg (76%) von ?? als farbloser Feststoff, **R<sub>f</sub>** (Hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:1) = 0.42. **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 8.05-7.98 (m, 2H, H-4/-5), 7.45-7.33 (m, 1H, H-8), 7.27-7.24 (m, 3H, H-6/-7/-21), 7.19-7.17 (m, 1H, H-24), 6.97-6.94 (m, 2H, H-20/22), 6.88 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H-4), 6.76 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, H-1), 5.36 (s, 2H, H-18), 4.65 (s, 2H, H-14) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 169.4 (C-15), 154.5 (C-2), 139.8 (C-13), 138.7 (C-21), 129.8 (C-12), 129.5 (C-17), 126.2 (C-24), 125.7 (C-4/-22), 125.0 (C-19), 123.7 (C-18/-20), 122.5 (C-7/-10), 121.3 (C-5), 119.8 (C-6), 117.0 (C-11), 108.3 (C-8), 107.4 (C-3), 94.3 (C-1), 84.2 (C-23), 66.3. (C-14), 46.2 (C-16) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 440 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-(3-(Trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoylchlorid (217)**

4-(3-(Trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoesäure (36 mg, 156  $\mu$ mol) wird in Thionylchlorid (0.50 mL) gelöst und die Reaktionslösung wird 12h bei RT im Dunklen gerührt. Nach vorsichtiger Entfernung des Thionylchlorids bei 40 mbar wird das Produkt direkt weiter umgesetzt. Ausbeute: 38 mg (99%) von **217** als farbloser Feststoff. **HPLC** (Methode 5): 7.45 min (95%).

***tert*-Butyl-2-(9-(4-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoyl)-9*H*-carbazol-2-yloxy)-acetat (218)**

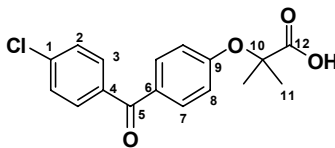
*tert*-Butyl-2-(9*H*-carbazol-2-yloxy)acetat (8 mg, 0.027 mmol) und DMAP (16 mg, 0.040 mmol) werden in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) gelöst und das in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) gelöste Säurechlorid (10 mg, 0.040 mmol) wird tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wird 7h bei RT im Dunkeln gerührt. Nach Zugabe von Wasser (2 mL) und Diethylether (100 mL) wird mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 M, 5 mL), dest. Wasser (3x 10 mL) und NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels LC (Hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:4). Ausbeute: 4 mg (29%) von Substanz **218** als farbloser Feststoff, **R<sub>f</sub>** (Hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:4) = 0.66. **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 8.05-7.98 (m, 2H, H-4/-5), 7.45-7.33 (m, 1H, H-8), 7.27-7.24 (m, 2H, H-6/-7), 7.19-7.17 (m, 2H, H-18), 6.97-6.94 (m, 2H, H-19), 6.88 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H-4), 6.76 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, H-1), 4.65 (s, 2H, H-14), 1.38 (s, 9H, H-17) ppm.

**2-(9-(4-(3-(Trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoyl)-9*H*-carbazol-2-yloxy)essigsäure (219)**

Der *tert*-Butylester **218** (4 mg, 8  $\mu$ mol) wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (0.4 mL) wird hinzugegeben. Diese Lösung wird 6 h gerührt, anschließend filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 3 mg (82%) von **219** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (Hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  4:1) = 0.42.  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8.21-8.08 (m, 2H, H-4/-5), 7.65-7.38 (m, 1H, H-8), 7.27-7.23 (m, 2H, H-6/-7), 7.21-7.19 (m, 2H, H-18), 6.98-6.95 (m, 2H, H-19), 6.89 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H-4), 6.78 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, H-1), 4.66 (s, 2H, H-14) ppm.

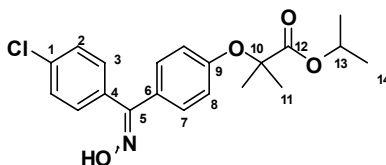
### 5.3.7 Synthese von Fenofibrat-abgeleiteten GSMs

#### 2-(4-(4-Chlorbenzoyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (**220**, BSc3932)



Nach AAV17 wird Fenofibrat (1.00 g, 2.77 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 837 mg (96%) von **220** als farbloser Feststoff,  $R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1) = 0.32, **HPLC** (Methode 1): 5.64 min (93%). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz):**  $\delta$  = 7.27-7.44 (m, 4H, H-3/-7), 7.26 (dd,  $J$  = 8.9 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 2H, H-2), 6.75 (dd,  $J$  = 9.0 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 2H, H-8), 1.52 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 6H, H-11) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 193.2 (C-5), 174.4 (C-12), 159.5 (C-9), 136.3 (C-1), 131.8 (C-4), 131.1 (C-3), 129.3 (C-7), 128.5 (C-2), 125.1 (C-6), 117.0 (C-8), 78.9 (C-10), 25.1 (C-11) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 318 ( $M^+$ ).

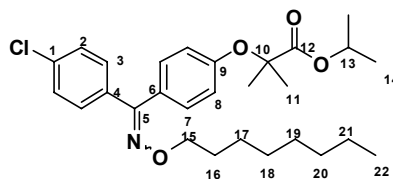
#### Isopropyl-2-(4-((4-chlorphenyl)(hydroxyimin)methyl)phenoxy)-2-methyl- propanoat (**115**, BSc3933)



Eine Lösung von Fenofibrat (2.000 g, 5.54 mmol) und Hydroxylamin-Hydrochlorid (0.962 g, 13.86 mmol) in absol. EtOH (10 mL) und Pyridin (22 mL) wird bei 80 °C für 4 h erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL) aufgenommen und mit dest. Wasser (3x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg (25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wird durch LC gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1). Ausbeute: 1.46 g (71 %) von **115** als farbloser Feststoff (E/Z 1:1),  $R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1) = 0.45, **HPLC** (Methode 1): 8.604 min (97%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8.6 (s, OH), 7.27-7.44 (m, 4H), 7.26 (dd,  $J$  = 8.9 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 2H), 6.75 (dd,  $J$  = 9.0 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 2H), 5.09 (m, 1H), 1.6 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 6H), 1.15 (dd,  $J$  = 11.9, 5.6 Hz, 6H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 173.5 (C-12), 156.4 (C-9), 135.3 (C-5), 134.9 (C-1), 131.2 (C-4), 130.7 (C-3), 129.4 (C-7), 129.3 (C-2), 125.1 (C-6), 117.9 (C-8), 79.2 (C-10), 69.1 (C-13), 25.4 (C-11), 21.5 (C-14) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 376 ( $M^+$ ).

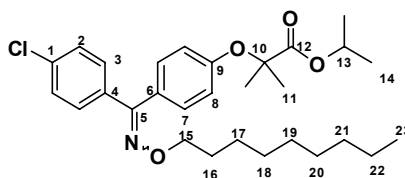


**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)octyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (221, BSc3974)**



Nach AAV18 wird **115** (300 mg, 0.80 mmol) mit NaH (38 mg, 0.96 mmol) und Iodoctan (230 mg, 0.96 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 190 mg (52%) von **221** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 11.44 min (89%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.32-7.18 (m, 4H), 6.78 (dd,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 2.0 Hz, 2H), 6.71 (dd,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 2H), 4.98 (m, 1H), 4.06 (t,  $J$  = 10 Hz, 2H, H-15), 1.59-1.52 (m, 8H), 1.18-1.12 (m, 16H), 0.79 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 3H; H-22) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 173.5 (C-12), 156.7 (C-9), 154.8 (C-5), 134.5 (C-1), 132.0 (C-4), 130.8 (C-3), 129.8 (C-6), 129.4 (C-7), 128.7 (C-2), 118.3 (C-8), 79.2 (C-10), 74.8 (C-15), 69.0 (C-13), 31.9 (C-20), 29.6 (C-19), 29.5 (C-18), 29.4 (C-17), 25.9 (C-16), 25.5 (C-11), 22.7 (C-21), 21.5 (C-14), 14.1 (C-22) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 510 (M+Na)<sup>+</sup>.

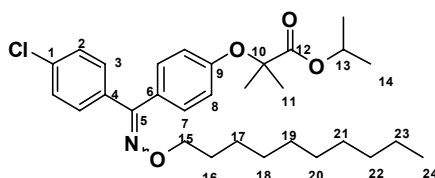
**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)(nonyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (222, BSc3975)**



Nach AAV18 wird **115** (300 mg, 0.80 mmol) mit NaH (38 mg, 0.96 mmol) und 1-Bromnonan (200 mg, 0.96 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 190 mg (50%) von **222** als farbloses Öl. **HPLC** (Methode 1): 11.75 min (87%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.33-7.17 (m, 4H), 6.78 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.71 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 5.00 (m, 1H), 4.08 (m, 2H, H-15), 1.58-1.51 (m, 8H), 1.18-1.12 (m, 18H), 0.80 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 3H; H-23) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 172.5 (C-12), 155.7 (C-9), 153.8 (C-5), 134.7 (C-1), 130.9 (C-4), 129.9

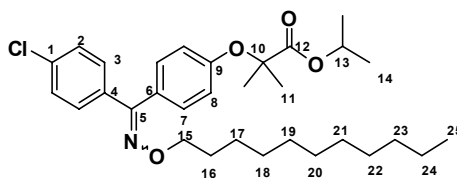
(C-3), 128.8 (C-6), 128.4 (C-7), 127.7 (C-2), 117.3 (C-8), 78.1 (C-10), 73.8 (C-15), 68.1 (C-13), 30.9 (C-21), 28.7 (C-20), 28.5 (C-19), 28.4 (C-18), 28.2 (C-17), 24.9 (C-16), 24.4 (C-11), 21.7 (C-22), 20.5 (C-14), 13.1 (C-23) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 524$  (M+Na).

**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)(decyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (223, BSc3976)**



Nach AAV18 wird **115** (200 mg, 0.53 mmol) mit NaH (24 mg, 0.64 mmol) und 1-Bromdecan (142 mg, 0.64 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 170 mg (68%) von **223** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 10.63 min (84%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.43-7.24 (m, 4H), 6.94 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.85 (d,  $J$  = 8.9, 2H), 5.10 (m, 1H), 4.16 (m, 2H, H-15), 1.86 (m, 2H), 1.68-1.60 (m, 8H), 1.27-1.21 (m, 18H), 0.80 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, H-24) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 173.5 (C-12), 156.7 (C-9), 154.8 (C-5), 135.7 (C-1), 131.9 (C-4), 129.8 (C-3), 128.4 (C-6), 128.7 (C-7), 128.3 (C-2), 118.3 (C-8), 79.2 (C-10), 74.8 (C-15), 69.0 (C-13), 34.0 (C-22), 32.9 (C-21), 31.9 (C-20), 29.6 (C-19), 29.5 (C-18), 29.4 (C-17), 25.9 (C-16), 25.7 (C-11), 21.5 (C-23), 21.5 (C-14), 14.1 (C-24) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 538$  (M+Na).

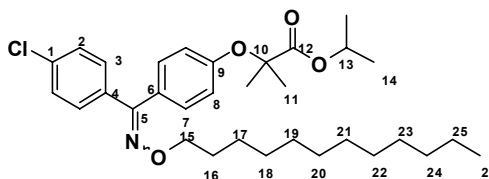
**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)(undecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (224, BSc3977)**



Nach AAV18 wird **115** (50 mg, 0.13 mmol) mit NaH (6 mg, 0.16 mmol) und 1-Bromundecan (38 mg, 0.16 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 48 mg (70%) von **224** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 11.66 min (99%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.41-7.32 (m, 4H), 6.86 (d,  $J$  = 9 Hz, 2H), 6.79 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 5.08 (m, 1H), 4.14 (m, 2H, H-15), 3.41 (m, 2H), 1.91-1.84 (m, 2H), 1.67-1.60 (m, 8H), 1.27-1.20 (m, 18H), 0.80 (t,  $J$  = 6 Hz, 3H; H-25) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 173.5 (C-12), 155.7 (C-9), 154.8 (C-5),

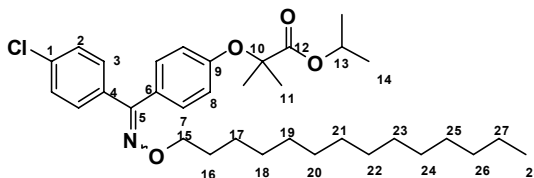
135.0 (C-1), 131.9 (C-4), 130.8 (C-3), 129.4 (C-6), 128.7 (C-7), 128.3 (C-2), 118.3 (C-8), 79.2 (C-10), 74.8 (C-15), 69.0 (C-13), 34.0 (C-23), 32.9 (C-21), 31.9 (C-20), 29.6 (C-19), 29.5 (C-18), 29.4 (C-17), 29.3 (C-22), 25.9 (C-16), 25.5 (C-11), 22.7 (C-24), 21.5 (C-14), 14.1 (C-24) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 552$  (M+Na).

**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)(dodecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (225, BSc3978)**



Nach AAV18 wird **115** (50 mg, 0.13 mmol) mit NaH (6 mg, 0.16 mmol) und 1-Bromdodecan (40 mg, 0.16 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 56 mg (79%) von **225** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 11.45 min (90%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.32-7.19 (m, 4H), 6.78 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.71 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 5.01 (m, 1H), 4.08 (m, 2H, H-15), 3.33 (m, 2H), 1.79-1.76 (m, 2H), 1.56-1.53 (m, 4H), 1.36-1.33 (m, 6H), 1.24-1.13 (m, 18H), 0.81 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3H; H-26) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 176.0 (C-12), 156.7 (C-9), 155.8 (C-5), 134.2 (C-1), 134.9 (C-4), 133.2 (C-3), 131.7 (C-6), 131.1 (C-7), 130.6 (C-2), 120.6 (C-8), 81.5 (C-10), 77.1 (C-15), 71.5 (C-13), 36.3 (C-24), 35.13 (C-23), 34.2 (C-22), 31.9 (C-21), 31.9 (C-20), 31.8 (C-19), 31.7 (C-18), 31.6 (C-17), 28.2 (C-11), 27.6 (C-25), 25.0 (C-16), 23.8 (C-14), 16.4 (C-24) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 567$  (M+Na).

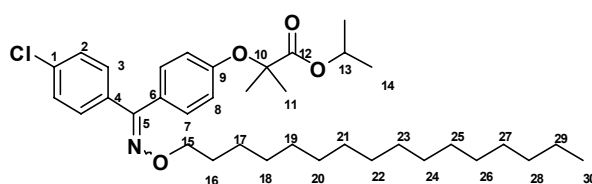
**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)(tetradecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (226, BSc3979)**



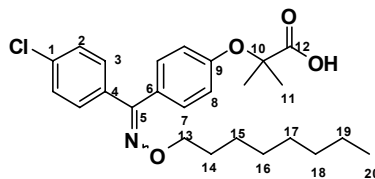
Nach AAV18 wird **115** (50 mg, 0.13 mmol) mit NaH (6 mg, 0.16 mmol) und 1-Bromtetradecan (44 mg, 0.16 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 42 mg (56%) von **226** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 12.65 min (98%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.33-7.18 (m, 4H), 6.78 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.71 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 5.01 (m, 1H), 4.08

(m, 2H, H-15), 3.34 (m, 2H), 1.79-1.77 (m, 4H), 1.59-1.52 (m, 8H), 1.34-1.26 (m, 22H), 0.81 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H; H-28) ppm.  **$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 174.4$  (C-12), 157.0 (C-9), 156.3 (C-5), 136.0 (C-1), 134.8 (C-4), 132.2 (C-3), 131.2 (C-6), 131.1 (C-7), 129.7 (C-2), 118.6 (C-8), 79.5 (C-10), 75.1 (C-15), 69.3 (C-13), 34.3 (C-26), 33.2 (C-25), 33.2 (C-24), 30.0 (C-23), 29.9 (C-22), 29.9 (C-21), 29.8 (C-20), 29.7 (C-19), 29.4 (C-18), 29.1 (C-17), 28.4 (C-11), 28.3 (C-16), 23.0 (C-27), 21.8 (C-14), 14.4 (C-28) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 594$  (M+Na).

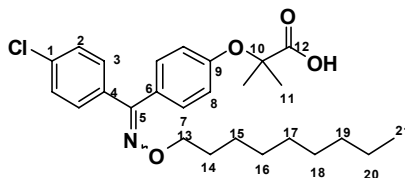
**Isopropyl 2-(4-((4-chlorophenyl)(hexadecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (227, BSc3980)**



Nach AAV18 wird **115** (50 mg, 0.13 mmol) mit NaH (6 mg, 0.16 mmol) und 1-Bromhexadecan (49 mg, 0.16 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 57 mg (73%) von **227** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 12.61 min (80%).  **$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.40$ -7.28 (m, 4H), 6.79 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.76 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.16 (m, 2H, H-15), 3.41 (m, 2H), 1.88-1.84 (m, 4H), 1.64-1.60 (m, 8H), 1.44-1.42 (m, 4H), 1.27-1.20 (m, 22H), 0.81 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H; H-30) ppm.  **$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 173.5$  (C-12), 157.0 (C-9), 156.3 (C-5), 136.0 (C-1), 134.8 (C-4), 130.8 (C-3), 129.4 (C-6), 128.7 (C-7), 128.3 (C-2), 118.3 (C-8), 78.4 (C-10), 74.2 (C-15), 69.1 (C-13), 34.0 (C-28), 32.9 (C-27), 31.9 (C-26), 29.7 (C-25), 29.5 (C-24), 29.4 (C-23), 29.3 (C-22), 29.1 (C-21), 28.8 (C-20), 28.6 (C-19), 28.5 (C-18), 28.2 (C-17), 28.3 (C-16), 25.5 (C-11), 22.7 (C-29), 21.5 (C-14), 14.1 (C-30) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 623$  (M+Na).

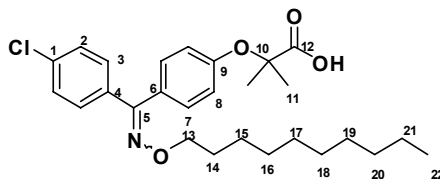
**2-(4-((4-Chlorphenyl)(octyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (117, BSc3934)**

Nach AAV17 wird **221** (190 mg, 0.43 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 170 mg (98%) von **117** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 9.89 min (83%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.44-7.21 (m, 4H), 6.94 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.85 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 4.11 (m, 2H, H-13), 3.31 (m, 2H), 1.64-1.58 (m, 6H), 1.33-1.21 (m, 10H), 0.89 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 3H, H-20) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 178.6 (C-12), 158.3 (C-9), 158.4 (C-5), 137.0 (C-1), 135.6 (C-4), 133.6 (C-3), 131.7 (C-6), 129.7 (C-7), 129.3 (C-2), 119.7 (C-8), 75.6 (C-10), 75.5 (C-13), 32.9 (C-18), 30.4 (C-17), 30.2 (C-16), 30.1 (C-14), 27.1 (C-15), 25.8 (C-11), 23.7 (C-19), 14.5 (C-20) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 446 ( $M^+$ ).

**2-(4-((4-Chlorphenyl)(nonyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (118, BSc3935)**

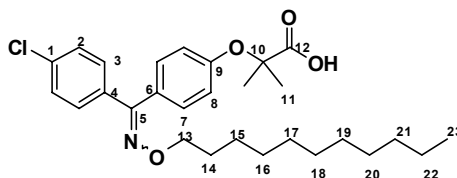
Nach AAV17 wird **222** (270 mg, 0.60 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 240 mg (97%) von **118** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 9.80 min (88%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.43-7.21 (m, 4H), 6.94 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.85 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 2H), 4.11 (m, 2H, H-13), 3.31 (m, 2H), 1.65-1.58 (m, 6H), 1.27-1.21 (m, 12H), 0.89 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, H-20) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 178.6 (C-12), 158.4 (C-9), 158.4 (C-5), 135.6 (C-1), 135.6 (C-4), 131.9 (C-3), 131.7 (C-6), 130.5 (C-7), 129.7 (C-2), 119.6 (C-8), 75.6 (C-10), 75.5 (C-13), 33.1 (C-19), 30.7 (C-18), 30.4 (C-17), 30.3 (C-16), 30.1 (C-14), 27.1 (C-15), 25.9 (C-11), 23.7 (C-20), 14.5 (C-21) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 460 ( $M^+$ ).

**2-(4-((4-Chlorphenyl)(decyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (119, BSc3936)**

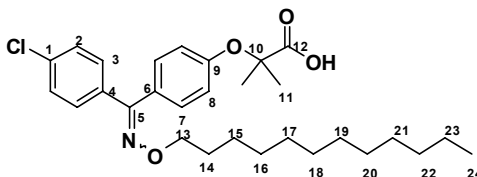


Nach AAV17 wird **223** (115 mg, 0.23 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 85 mg (78%) von **119** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 10.59 min (83%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.43-7.21 (m, 4H), 6.91 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.85 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 4.11 (m, 2H, H-13), 3.31 (m, 2H), 1.65-1.58 (m, 6H), 1.27-1.21 (m, 14H), 0.89 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, H-20) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 177.6 (C-12), 158.2 (C-9), 156.4 (C-5), 135.6 (C-1), 133.6 (C-4), 132.0 (C-3), 131.7 (C-6), 131.1 (C-7), 129.4 (C-2), 119.7 (C-8), 80.3 (C-10), 75.5 (C-13), 33.1 (C-20), 30.7 (C-19), 30.6 (C-18), 30.5 (C-17), 30.4 (C-16), 30.2 (C-14), 27.1 (C-15), 25.8 (C-11), 23.8 (C-21), 14.5 (C-22) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 474 ( $M^+$ ).

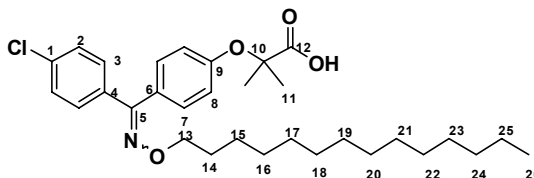
**2-(4-((4-Chlorphenyl)(undecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (120, BSc3937)**



Nach AAV17 wird **224** (30 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 22 mg (75%) von **120** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 10.69 min (83%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.37-7.12 (m, 4H), 6.93 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.82 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2H), 4.04 (m, 2H, H-13), 3.25 (dd,  $J$  = 3.24, 1.63 Hz, 2H), 1.74-1.40 (m, 6H), 1.37-1.02 (m, 16H), 0.84 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-20) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 177.1 (C-12), 158.3 (C-9), 156.4 (C-5), 137.4 (C-1), 133.8 (C-4), 132.5 (C-3), 131.2 (C-6), 131.0 (C-7), 129.9 (C-2), 119.7 (C-8), 81.7 (C-10), 76.3 (C-13), 33.6 (C-21), 31.3 (C-20), 31.2 (C-19), 31.0 (C-18), 30.7 (C-17), 30.7 (C-16), 27.6 (C-14), 27.0 (C-15), 27.0 (C-11), 24.3 (C-22), 15.4 (C-23) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 488 ( $M^+$ ).

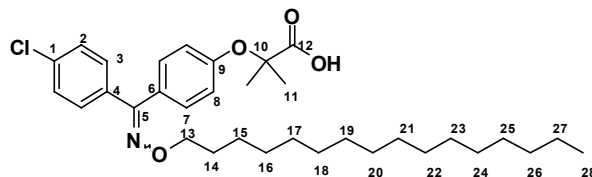
**2-(4-((4-Chlorphenyl)(dodecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (121, BSc3938)**

Nach AAV17 wird **225** (33 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 20 mg (66%) von **121** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 10.89 min (94%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.41-7.13 (m, 4H), 6.89 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.77 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.10-3.96 (m, 2H), 3.23 (m, 2H), 1.64-1.38 (m, 6H), 1.36-1.13 (m, 18H), 0.79 (t,  $J$  = 6.63, 3H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 178.9 (C-12), 159.1 (C-9), 157.3 (C-5), 138.2 (C-1), 137.4 (C-4), 132.4 (C-3), 130.1 (C-6), 130.1 (C-7), 129.7 (C-2), 119.0 (C-8), 88.2 (C-10), 65.4 (C-13), 33.5 (C-22), 31.2, 31.2, 30.9, 27.6, 27.5, 27.1, 27.0, 24.2, 24.1, 20.5 (C-23), 15.2 (C-24) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 502 ( $M^+$ ).

**2-(4-((4-Chlorphenyl)(tetradecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (122, BSc3939)**

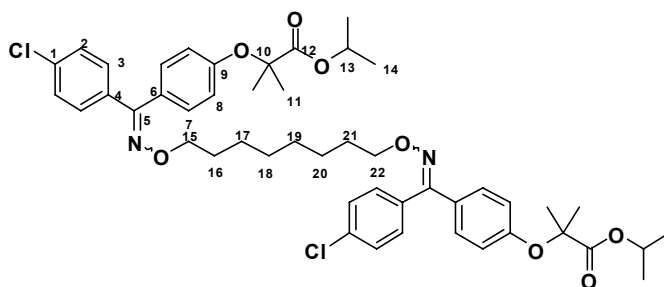
Nach AAV17 wird **226** (34 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 24 mg (75%) von **122** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 11.12 min (90%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.43-7.12 (m, 4H), 6.87 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 6.77 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 4.10-4.05 (m, 2H), 3.32-3.30 (m, 2H), 1.77-1.47 (m, 6H), 1.21-1.35 (m, 20H), 0.80 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 3H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 177.6 (C-12), 158.4 (C-9), 156.9 (C-5), 140.4 (C-1), 137.3 (C-4), 132.9 (C-3), 132.5 (C-6), 131.1 (C-7), 130.4 (C-2), 119.5 (C-8), 81.0 (C-10), 74.7 (C-13), 35.3 (C-24), 34.5, 33.6, 31.3, 31.1, 31.1, 31.0, 30.4, 29.8, 26.9, 26.7, 24.3 (C-11), 22.9 (C-25), 15.4 (C-26) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 530 ( $M^+$ ).

**Isopropyl-2-(4-((4-chlorophenyl)(hexadecyloxyimin)methyl)phenoxy)-2-methyl-propanoat (123, BSc3940)**



Nach AAV17 wird **227** (36 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 26 mg (78%) von **123** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 11.2 min (89%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.73-7.15 (m, 4H), 6.80 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.73 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.34-3.32 (m, 2H), 1.76-1.73 (m, 2H), 1.57-1.48 (m, 2H), 1.34-1.31 (m, 6H), 1.19-1.12 (m, 22H), 0.78 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 3H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 178.2 (C-12), 158.9 (C-9), 158.9 (C-5), 139.2 (C-1), 138.7 (C-4), 135.2 (C-3), 135.1 (C-6), 133.0 (C-7), 132.6 (C-2), 122.8 (C-8), 83.5 (C-10), 78.9 (C-13), 37.2 (C-26), 37.0, 36.2, 34.0, 33.8, 33.5, 33.4, 33.2, 32.8, 32.5, 31.2, 30.3, 29.7, 27.0 (C-11), 25.8 (C-27), 18.5 (C-28) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 558 ( $M^+$ ).

**Isopropyl-2,2'-(4,4'-(1,14-bis(4-chlorophenyl)-3,12-dioxa-2,13-diazatetradeca-1,13-dien-1,14-diyl)bis(4,1-phenylen))bis(oxy)bis(2-methylpropanoat) (228, BSc3981)**

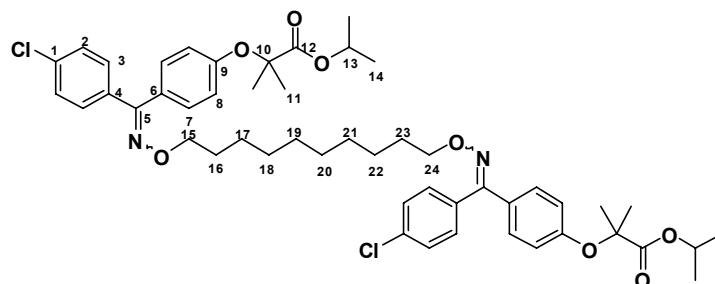


Nach AAV19 wird **115** (100 mg, 0.26 mmol) mit NaH (11 mg, 0.26 mmol) und 1,8-Dibromooctan (33 mg, 0.12 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 64 mg (62%) von **228** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 1): 12.68 min (92%). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.31-7.18 (m, 8H), 6.77-6.71 (m, 8H), 5.08-4.97 (m, 2H), 4.07 (m, 4H, H-15, H-22), 1.59-1.52 (m, 16H), 1.24-1.12 (m, 20H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 172.5 (C-12), 155.7 (C-9), 153.8 (C-5), 134.0 (C-1), 132.0 (C-4), 130.8 (C-3), 129.8 (C-6), 129.4 (C-7),



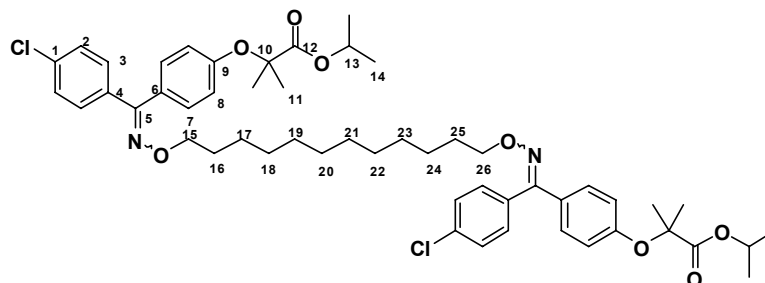
128.7 (C-2), 117.3, 116.6, 116.3 (C-8), 78.2, 78.1, (C-10), 73.7 (C-15, C-22), 68.1, 68.3 (C-13), 28.7, 28.1, 24.9, 24.5, 20.5 (C-14) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 862$  ( $M^+$ ).

**Isopropyl-2,2'-(4,4'-(1,16-bis(4-chlorophenyl)-3,14-dioxa-2,15-diazahehexadeca-1,15-dien-1,16-diyl)bis(4,1-phenylen))bis(oxy)bis(2-methylpropanoat) (229, BSc3982)**



Nach AAV19 wird **115** (100 mg, 0.26 mmol) mit NaH (11 mg, 0.26 mmol) und 1,10-Dibromdecan (36 mg, 0.12 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 56 mg (52%) von **229** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 11.76 min (88%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.39\text{--}7.27$  (m, 8H), 6.89–6.68 (m, 8H), 5.03–4.98 (m, 2H), 4.16–4.14 (m, 4H, H-15, H-24), 1.70–1.56 (m, 16H), 1.26–1.21 (m, 24H) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 173.4$  (C-12), 157.8 (C-9), 154.9 (C-5), 134.0 (C-1), 132.0 (C-4), 131.6 (C-3), 129.8 (C-6), 129.6 (C-7), 128.7 (C-2), 118.4, 116.6 (C-8), 78.4 (C-10), 73.8, 73.7 (C-15, C-24), 68.3 (C-13), 29.7, 29.1, 28.8, 26.4, 25.9, 25.5, 24.5, 24.1, 20.4 (C-14) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 912$  ( $M+\text{Na}$ ).

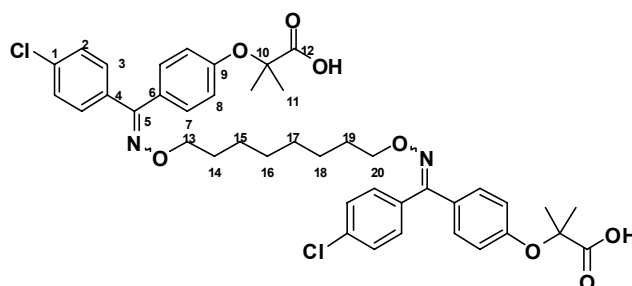
**Isopropyl-2,2'-(4,4'-(1,18-bis(4-chlorophenyl)-3,16-dioxa-2,17-diazaoctadeca-1,17-dien-1,18-diyl)bis(4,1-phenylen))bis(oxy)bis(2-methylpropanoat) (230, BSc3983)**



Nach AAV19 wird **115** (100 mg, 0.26 mmol) mit NaH (11 mg, 0.26 mmol) und 1,12-Dibromdodecan (40 mg, 0.12 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 54 mg (49%) von **230** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 11.26 min (75%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,**

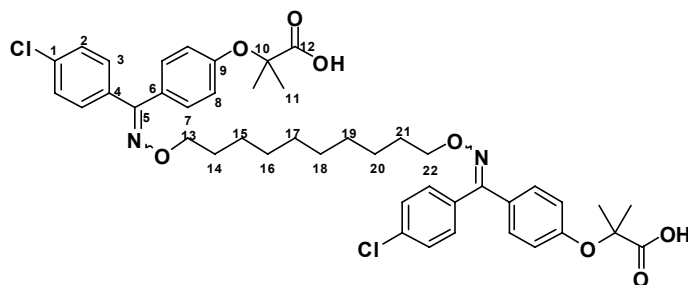
**CDCl<sub>3</sub>**:  $\delta$  = 7.46-7.24 (m, 8H), 6.82-6.79 (m, 8H), 5.20-5.01 (m, 2H), 4.11-4.04 (m, 4H, H-15, H-26), 1.62-1.52 (m, 16H), 1.19-1.12 (m, 28H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 174.5 (C-12), 156.6 (C-9), 153.9 (C-5), 132.8 (C-1), 132.0 (C-4), 131.2 (C-3), 130.8 (C-6), 128.9, (C-7), 128.7 (C-2), 118.4, 119.6, 118.3 (C-8), 77.6 (C-10), 74.8, 74.8 (C-15, C-26), 69.1 (C-13), 29.6, 29.4, 29.1, 28.8, 26.4, 25.9, 25.5, 24.5, 24.1, 21.5 (C-14) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 940 (M+Na).

**2,2'-(4,4'-(1,18-Bis(4-chlorophenyl)-3,16-dioxa-2,17-diazaoctadeca-1,17-dien-1,18-diyl)-bis(4,1-phenylen))bis(oxy)bis(2-methylpropansäure) (124, BSc3941)**



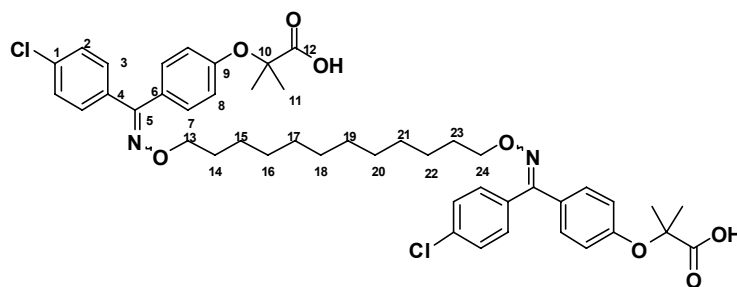
Nach AAV17 wird **228** (50 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 43 mg (92%) von 124 als farbloses Öl, HPLC (Methode 5): 10.60 min (96%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 7.29-7.16 (m, 8H), 6.82-6.73 (m, 8H), 4.68-4.01 (m, 4H, H-13, H-20), 1.57-1.50 (m, 16H), 1.24-1.67 (m, 8H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  = 178.2 (C-12), 158.8 (C-9), 158.4 (C-5), 137.3, 136.3 (C-1), 133.7, 133.7 (C-4), 132.9, 132.5 (C-3), 131.6, 131.1 (C-6), 130.5, 130.3 (C-7), 130.0, 129.9 (C-2), 119.9, 119.3 (C-8), 80.8 (C-10), 76.3, 76.2 (C-13, C-20), 31.3, 30.7, 27.5, 26.7 (C-11) ppm. **MS (ESI)**:  $m/z$  = 777 (M<sup>+</sup>).

**2,2'-(4,4'-(1,16-Bis(4-chlorphenyl)-3,14-dioxa-2,15-diazahexadeca-1,15-dien-1,16-diyl)-bis(4,1-phenylen))bis(oxy)bis(2-methylpropansäure) (125, BSc3942)**



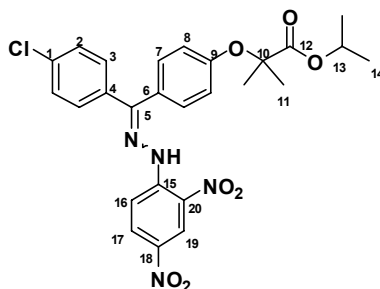
Nach AAV17 wird **229** (53 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 47 mg (88%) von **125** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 11.02 min (93%). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.31-7.18 (m, 8H), 6.87-6.74 (m, 8H), 4.07-4.03 (m, 4H, H-13, H-22), 1.60-1.51 (m, 16H), 1.27-1.20 (m, 12H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 178.2 (C-12), 158.4 (C-9), 157.7, 157.0 (C-5), 137.3, 136.8 (C-1), 133.8, 133.7 (C-4), 132.9, 132.5 (C-3), 131.6, 131.1 (C-6), 130.4, 130.3 (C-7), 130.0, 129.9 (C-2), 119.9, 119.4 (C-8), 80.8, 80.8 (C-10), 76.4, 76.3 (C-13, C-22), 31.3, 31.0, 30.7, 27.6, 26.8, 26.7 (C-11) ppm. **MS (ESI)**: m/z = 806 (M<sup>+</sup>).

**2,2'-(4,4'-(1,18-Bis(4-chlorphenyl)-3,16-dioxa-2,17-diazaoctadeca-1,17-dien-1,18-diyl)bis(4,1-phenylen))bis(oxy)bis(2-methylpropansäure) (126, BSc3943)**



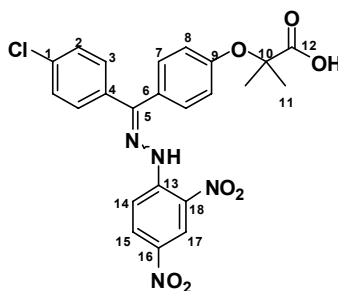
Nach AAV17 wird **230** (55 mg, 0.06 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 45 mg (88%) von **126** als farbloses Öl, **HPLC** (Methode 5): 11.68 min (96%). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.39-7.18 (m, 8H), 6.80-6.69 (m, 8H), 4.08-4.04 (m, 4H, H-13, H-24), 1.58-1.46 (m, 16H), 1.20-1.14 (m, 16H) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 178.4 (C-12), 155.7, 155.2 (C-9), 154.2, 154.2 (C-5), 134.6, 133.7 (C-1), 131.2, 131.0 (C-4), 129.9, 129.9 (C-3), 128.8, 128.5 (C-6), 127.9, 127.7 (C-7), 127.5, 127.4 (C-2), 116.9, 116.5 (C-8), 78.4 (C-10), 73.9, 73.8 (C-13, C-24), 32.4, 28.7, 28.2, 27.7, 27.1, 25.0, 24.4, 20.5 (C-11) ppm. **MS (ESI)**: m/z = 850 (M<sup>+</sup>).

**Isopropyl-2-(4-((4-chlorphenyl)(2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazon)methyl)phenoxy)-2-methylpropanoat (231, BSc3899)**



Zu einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0.160 g, 0.82 mmol) in Methanol (8 mL) und einer katalytischen Menge an konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wird eine Lösung von Fenofibrat (0.200 g, 0.55 mmol) in Methanol (5 mL) getropft. Die Reaktionslösung wird 2 h bei 50 °C gerührt. Der gebildete Niederschlag wird filtriert, mit kaltem Methanol, Wasser und  $\text{KHCO}_3$ -Lösung (3%) gewaschen. Die Trocknung erfolgt im Hochvakuum. Ausbeute: 205 mg (70%) von **231** als roter Feststoff,  $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 10:1) = 0.9$ , **HPLC** (Methode 1):  $t_r = 9.86$  min (90%).  **$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 9.07$  (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-19), 8.16 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-17), 8.36 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-16), 7.66-7.51 (m, 2H, H-3), 7.40-7.20 (m, 2H, H-7), 7.11 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2), 6.855 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-8), 5.14-5.05 (m, 1H, H-13), 1.73-1.53 (m, 6H, H-11), 1.31-1.18 (m, 6H, H-13) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 173.3$  (C-12), 157.4 (C-9), 155.6 (C-5), 145.2 (C-15), 138.8 (C-18), 136.6 (C-1), 131.0 (C-17), 130.8 (C-4), 130.6 (C-3), 129.8 (C-7), 128.9 (C-2), 129.0 (C-20), 124.5 (C-6), 123.4 (C-19), 116.6 (C-16), 114.5 (C-8), 79.4 (C-10), 69.4 (C-13), 25.4 (C-11), 21.5 (C-14) ppm. **MS (ESI):**  $m/z = 539$  ( $\text{M}^+$ ).

**2-(4-((4-Chlorphenyl)(2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazon)methyl)phenoxy)-2-methylpropansäure (116, BSc3989)**



Nach AAV17 wird **231** (141 mg, 0.26 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute: 36 mg (28%) von **116** als roter Feststoff.  $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:2) = 0.63$ , **HPLC** (Methode 1):

8.68 min (75%). **<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 8.88 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1H, H-17), 8.16 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H-15), 8.36 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H-14), 7.66-7.51 (m, 2H, H-3), 7.40-7.20 (m, 2H, H-7), 7.11 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-2), 6.855 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-8), 1.53 (s, 6H, H-11) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 175.2 (C-12), 157.4 (C-9), 155.6 (C-5), 144.8 (C-13), 138.8 (C-16), 136.4 (C-1), 131.0 (C-4), 130.3 (C-3), 130.0 (C-15), 129.6 (C-2), 129.0 (C-18), 124.4 (C-6), 123.4 (C-17), 116.6 (C-14), 114.8 (C-8), 79.3 (C-10), 69.4 (C-13), 25.7 (C-11) ppm. **MS (ESI):**  $m/z$  = 497 ( $M^+$ ).

## 5.4 Assays

### *Inhibitionsassays mit Hexapeptidsequenzen:*

Die folgenden Assays wurden am EMBL Heidelberg im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthalts bei Dr. Luis Serrano durchgeführt.

*Probenvorbereitung der Fibrillen:* Die peptidischen Stammlösungen werden hergestellt, indem eine exakte Menge an Peptid in Puffer (20 mM Glycin/HCl, pH 2.6) gelöst wird. Die Lösungen werden 10 min mit Ultraschall behandelt, um bereits gebildete Nucei wieder aufzulösen und zentrifugiert (5 min at 16,000 X g), um unlösliches Material abzutrennen. Die Proben werden 7 d bei RT in silikonisierten Eppendorfgläsern inkubiert.

*Probenvorbereitung der Verbindungen:* Die zu untersuchenden Verbindungen werden in Puffer (20 mM Glycin/HCl, pH 2.6) gelöst. Bei Löslichkeitsproblemen wird bis zu 5% DMSO zugegeben.

*Arresting assay:* In diesen Experimenten wird monomeres Peptid verwendet. Untersucht wird die Fähigkeit der Verbindung, den Prozess der Fibrillenbildung zu unterdrücken und so die Ablagerung von amyloidem Material zu verhindern. Der monomere Zustand des Peptids wird zu Beginn des Experiments durch EM untersucht. Die Inkubation des Hexapeptids mit den Verbindungen erfolgt bei RT und beträgt 7 Tage.

*A $\beta$  stretch (Ac-KLVFFA-Am):* Die A $\beta$ -Stammlösungen haben eine Konzentration von 2 mM und werden auf eine Endkonzentration von 1.5 mM verdünnt. Die Endkonzentration der Inhibitorlösung beträgt 300  $\mu$ M.

*Tau stretch (Ac-KVQIIN-Am):* Die Tau-Stammlösungen haben eine Konzentration von 500  $\mu$ M und werden auf eine Endkonzentration von 1.5 mM verdünnt. Die Endkonzentration der Inhibitorlösung beträgt 70  $\mu$ M.

*STVIIIE (NH<sub>2</sub>-STVIIIE-COOH):* Die STVIIIE-Stammlösungen haben eine Konzentration von 1 mM und werden auf eine Endkonzentration von 1.5 mM verdünnt. Die Endkonzentration der Inhibitorlösung beträgt 100  $\mu$ M.

*CysC (SFQIYA):* Die CysC-Stammlösungen haben eine Konzentration von 1.5 mM und werden auf eine Endkonzentration von 200  $\mu$ M verdünnt. Die Endkonzentration der Inhibitorlösung beträgt 70  $\mu$ M.

*Disassembling assays:* In diesen Experimenten werden bereits gebildete Fibrillen verwendet. Untersucht wird die Fähigkeit der Verbindungen, bereits gebildete Fibrillen aufzubrechen und wieder aufzulösen. Die Hexapeptide werden zunächst für die Fibrillenbildung 7 d bei r.t. inkubiert. Nach Zugabe der Verbindungen erfolgt eine weitere Inkubation bei r.t. von 7 d.

*Aβ stretch (Ac-KLVFFA-Am)*: Die Endkonzentration der *Aβ stretch*-Fibrillen beträgt 1.5 mM.

Die Endkonzentration des Inhibitors beträgt 300 μM.

*Tau stretch (Ac-KVQIIN-Am)*: Die Endkonzentration der *tau stretch*-Fibrillen beträgt 350 μM.

Die Endkonzentration des Inhibitors beträgt 70 μM.

*STVIIIE stretch (NH<sub>2</sub>-STVIIIE-COOH)*: Die Endkonzentration der *STVIIIE stretch*-Fibrillen beträgt 500 μM. Die Endkonzentration des Inhibitors beträgt 100 μM.

*CysC stretch (SFQIYA)*: Die Endkonzentration der *CysC stretch*-Fibrillen beträgt 1 mM. Die Endkonzentration des Inhibitors beträgt 200 μM.

*Aβ<sub>4</sub> -Inhibitionsassay*: Aβ<sub>42</sub>-Fibrillenbildung und die Bestimmung der Hemmwirkung der Verbindungen wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>[289]</sup> Die monomere Peptidlösung wurde durch Auflösung von 1 mg des Peptids in 1 mL 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) hergestellt.

*Toxizitätsassay*: Die Zelltoxizität wurde in SH-SY5Y-Zellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen MTT-Kits bestimmt.<sup>[289]</sup>

*Elektronenmikroskopische Auswertung*: Von jeder Probe werden zwei Grids hergestellt und untersucht. Die Menge an Fibrillen einer Probe wird durch visuelle Analyse der Grids quantifiziert. Die Beurteilung basiert auf einer Gesamtbewertung der Menge und Morphologie des Material auf dem gesamten Grid. Um einen repräsentativen Überblick des Grids zu erhalten, werden aus zufällig gewählten Feldern des Grids mindestens fünf Bilder aufgenommen. In Fällen einer starken Fibrillenreduktion wird der zweite Grid untersucht. Alle Experimente werden mindestens zweimal durchgeführt, um die beobachteten Trends zu bestätigen. Die Analyse wurde an einem Morgagni 268D Elektronenmikroskop durchgeführt.

#### ***Aβ liquid phase electrochemiluminescence (LPECL)-Assay:***

Der LPECL-Assay wurde von K. Baumann und Robert Schübenel von der Firma Hoffmann-La Roche durchgeführt.

Die hergestellten Verbindungen werden mittels des LPECL-Assays auf ihre inhibierende oder modulierende Wirkung auf die γ-Sekretase untersucht. Dabei werden die Konzentrationen an den verschiedenen Aβ-Isoformen untersucht. Verwendet wird eine aus stabilen, transfizierten menschlichen Neuroglioma-H4-Zellen erhaltene APP-überexprimierende Zelllinie. Für die C-terminale Sequenz der Aβ-Proteine werden für Aβ<sub>38</sub>, Aβ<sub>40</sub>, Aβ<sub>42</sub> die drei spezifischen Antikörper BAP15 (Aβ<sub>42</sub>), BAP24 (Aβ<sub>40</sub>), und BAP29 (Aβ<sub>38</sub>) verwendet. Diese Antikörper sind mit TAG-Estern, die zur Elektrochemilumineszenz fähig sind und unterschiedliche Aktivitätsbereiche

aufweisen, versehen. Für die N-terminale Sequenz wird ein mit Biotin versehener A $\beta$ -Antikörper (6E10-bio) verwendet. Die in DMSO gelösten Substanzen werden mit einem Zellkulturmedium zur gewünschten Konzentration verdünnt. 100  $\mu$ L der Substanzlösung werden zu den Zellen gegeben, die 20 bis 24 Stunden bei 37 °C inkubiert werden. 50  $\mu$ L des aufbereiteten Zellkulturmediums werden mit 50  $\mu$ L auf pH 7 gepufferten, paramagnetischen M-280 Eisenkügelchen und mit je 25  $\mu$ L Antikörper-Lösung versetzt. Die Lösung wird auf 250  $\mu$ L aufgefüllt und drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Synthetische A $\beta$ <sub>38,40,42</sub>-Peptide werden zur Kontrolle und für die Erstellung von Standardkurven verwendet. Die A $\beta$ -Peptide werden in DMSO auf 1 mg/ml gelöst und mit Zellkulturmedium auf 16–2000 pg/mL verdünnt. Die Elektrochemilumineszenz wird mit einem M8-Messgerät der Firma Bioveris gemessen und in die jeweiligen %-Anteile der A $\beta$ -Proteine in Bezug auf die Kontrolle umgerechnet. Für die Bestimmung der Überlebensrate werden 80  $\mu$ L der Zellkultur zu jeder Probe gegeben und inkubiert. Anschließend werden 20  $\mu$ L einer MTS/PES-Lösung hinzugegeben, und nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37 °C wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Die Zelltoxizität wird als %-Anteil einer unbehandelten Kontrolle angegeben.

#### ***Histologische Untersuchung der Gehirnschnitte:***

Die histologische Untersuchung erfolgte in der Pathologie des Klinikum Darmstadt in Zusammenarbeit mit Dr. Roland Heyny von Hausen.

Die Gehirnschnitte von Alzheimer-Patienten werden in Ahnlehnung an das Standardprotokoll für die Thioflavin-Färbung mit den Verbindungen gefärbt. Dazu werden die Schnitte zunächst 10 min in eine Haematoxylin-Lösung gegeben und anschließend 5 min mit Wasser gespült. Nach der Inkubation mit den Verbindungen für 5 min erfolgt erneut ein Waschgang mit EtOH–H<sub>2</sub>O (40:60 + 3% DMSO). Schließlich werden die Gehirnschnitte mit 1% Eisessig-Lösung fixiert und erneut 15 min mit Wasser gewaschen.

#### ***Thioflavin-S Assay:***

Die Untersuchung der Tau-Aggregation und PHF-Depolymerisation wurde von Dr. Markus Pickhardt am MPI Hamburg durchgeführt.

Für die Auswertung der Wirkung der Verbindungen auf Tau-Aggregation, wird ein Thioflavin-S Fluoreszenzassay verwendet.<sup>[216, 219]</sup>



## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. J. Selkoe *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741.
- [2] A. Alzheimer *Allg. Z. Psychiatrie* **1907**, 64, 146.
- [3] E. D. Thorsett, L. H. Latimer *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 377.
- [4] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, H. M. Wisniewski *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 6084.
- [5] M. Goedert, C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker, A. Klug *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 4051.
- [6] D. J. Selkoe *Neuron* **1991**, 6, 487.
- [7] C. Courtney, D. Farrell, R. Gray, R. Hills, L. Lynch, E. Sellwood, S. Edwards, W. Hardyman, J. Raftery, P. Crome, C. Lendon, H. Shaw, P. Bentham *Lancet* **2004**, 363, 2105.
- [8] J. S. Jacobsen *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 343.
- [9] M. C. Carlson, J. Brandt, C. Steele, A. Baker, Y. Stern, C. G. Lyketsos *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2001**, 56, M567.
- [10] B. Reisberg, R. Doody, A. Stoffler, F. Schmitt, S. Ferris, H. J. Mobius *New Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1333.
- [11] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandever, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert *Nature* **1999**, 400, 173.
- [12] B. Schmidt *ChemBioChem* **2003**, 4, 366.
- [13] B. Wolozin, W. Kellman, P. Ruosseau, G. G. Celesia, G. Siegel *Arch. Neurol.* **2000**, 57, 1439.
- [14] H. Jick, G. L. Zornberg, S. S. Jick, S. Seshadri, D. A. Drachman *Lancet* **2000**, 356, 1627.
- [15] K. Fassbender, M. Simons, C. Bergmann, M. Stroick, D. Lutjohann, P. Keller, H. Runz, S. Kuhl, T. Bertsch, K. Von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther, T. Hartmann *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 5856.
- [16] M. Simons, P. Keller, J. Dichgans, J. B. Schulz *Neurology* **2001**, 57, 1089.
- [17] J. C. Breitner *Neurobiol. Aging* **1996**, 17, 789.
- [18] B. A. in 't Veld, A. Ruitenbergh, A. Hofman, L. J. Launer, C. M. van Duijn, T. Stijnen, M. M. B. Breteler, B. H. C. Stricker *N. Engl. J. Med.* **2001**, 345, 1515.
- [19] S. Weggen, J. L. Eriksen, S. A. Sagi, C. U. Pietrzik, T. E. Golde, E. H. Koo *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 30748.
- [20] C. Haass, H. Steiner *Trends Cell Biol.* **2002**, 12, 556.
- [21] S. S. Sisodia, P. H. St George-Hyslop *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3, 281.
- [22] G. G. Glenner, C. W. Wong, V. Quaranta, E. D. Eanes *Appl. Pathol.* **1984**, 2, 357.
- [23] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, K. Beyreuther *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, 82, 4245.
- [24] R. Wang, D. Sweeney, S. E. Gandy, S. S. Sisodia *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 31894.
- [25] D. W. Dickson *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1997**, 56, 321.
- [26] D. J. Selkoe *Nature* **1999**, 399, A23.
- [27] C. Glabe *J. Mol. Neurosci.* **2001**, 17, 137.
- [28] B. Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6, 377.
- [29] G. Evin, A. Weidemann *Peptides* **2002**, 23, 1285.
- [30] D. M. Walsh, I. Klyubin, V. Fadeeva Julia, K. Cullen William, R. Anwyl, S. Wolfe Michael, J. Rowan Michael, J. Selkoe Dennis *Nature* **2002**, 416, 535.

- [31] J. Hardy, D. J. Selkoe *Science* **2002**, 297, 353.
- [32] M. Citron *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 92.
- [33] J. Hardy, D. Allsop *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, 12, 383.
- [34] J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, B. Muller-Hill *Nature* **1987**, 325, 733.
- [35] R. E. Tanzi, J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit, R. L. Neve *Science* **1987**, 235, 880.
- [36] D. J. Selkoe, M. B. Podlisny, C. L. Joachim, E. A. Vickers, G. Lee, L. C. Fritz, T. Oltersdorf *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 7341.
- [37] A. M. Wertkin, R. S. Turner, S. J. Pleasure, T. E. Golde, S. G. Younkin, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 9513.
- [38] F. Mahdi, W. E. Van Nostrand, A. H. Schmaier *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23468.
- [39] E. H. L. Koo, Peter T., Jr. Kelly, Jeffery W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 9989.
- [40] I. Nishimoto, T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, T. Okamoto, Y. Murayama, E. Ogata *Nature* **1993**, 362, 75.
- [41] M. Sastre, H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M. M. Condron, D. B. Teplow, C. Haass *EMBO J.* **2001**, 2, 835.
- [42] C. Haass, A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, D. B. Teplow, D. J. Selkoe *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3021.
- [43] C. Haass, E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung, D. J. Selkoe *Nature* **1992**, 357, 500.
- [44] M. Shoji, T. E. Golde, J. Ghiso, T. T. Cheung, S. Estus, L. M. Shaffer, X. D. Cai, D. M. McKay, R. Tintner, B. Frangione *Science* **1992**, 258, 126.
- [45] M. Mullan, F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, L. Lannfelt *Nat. Genet.* **1992**, 1, 345.
- [46] X. D. Cai, T. E. Golde, S. G. Younkin *Science* **1993**, 259, 514.
- [47] M. Citron *Expert Opin. Ther. Targets* **2001**, 5, 341.
- [48] R. Vassar, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.-C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron *Science* **1999**, 286, 735.
- [49] M. Goedert, M. G. Spillantini *Science* **2006**, 314, 777.
- [50] D. B. Teplow *Amyloid* **1998**, 5, 121.
- [51] I. W. Hamley *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 8128.
- [52] O. S. Makin, L. C. Serpell *FEBS Journal* **2005**, 272, 5950.
- [53] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, 17342.
- [54] H. Inouye, D. Sharma, W. J. Goux, D. A. Kirschner *Biophys. J.* **2006**, 90, 1774.
- [55] G. S. Jackson, L. L. Hosszu, A. Power, A. F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C. J. Craven, J. P. Waltho, A. R. Clarke, J. Collinge *Science* **1999**, 283, 1935.
- [56] N. M. Kad, N. H. Thomson, D. P. Smith, D. A. Smith, S. E. Radford *J. Mol. Biol.* **2001**, 313, 559.
- [57] L. Hou, H. Shao, Y. Zhang, H. Li, K. Menon Nanda, B. Neuhaus Elizabeth, M. Brewer John, L. Byeon In-Ja, G. Ray Dale, P. Vitek Michael, T. Iwashita, A. Makula Ronald, B. Przybyla Alan, G. Zagorski Michael *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1992.
- [58] S. Narayanan, B. Reif *Biochemistry* **2005**, 44, 1444.
- [59] M. Calamai, C. Canale, A. Relini, M. Stefani, F. Chiti, C. M. Dobson *J. Mol. Biol.* **2005**, 346, 603.
- [60] J. D. L. Harper, Charles M. Lansbury, Peter T., Jr. *Chem. Biol.* **1997**, 4, 951.
- [61] A. Lomakin, D. S. Chung, G. B. Benedek, D. A. Kirschner, D. B. Teplow *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 1125.

- [62] W. P. Esler, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, H. V. Vinters, J. P. Lee, P. W. Mantyh, J. E. Maggio *Biochemistry* **1996**, 35, 749.
- [63] H. Naiki, K. Nakakuki *Lab. Invest.* **1996**, 74, 374.
- [64] Y. Kusumoto, A. Lomakin, D. B. Teplow, G. B. Benedek *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 12277.
- [65] S. R. Collins, A. Douglass, R. D. Vale, J. S. Weissman *PLoS Biol.* **2004**, 2, 1499.
- [66] S. Narayanan, B. Kamps, W. C. Boelens, B. Reif *FEBS L.* **2006**, 580, 5941.
- [67] T. Petkova Aneta, D. Leapman Richard, Z. Guo, W.-M. Yau, P. Mattson Mark, R. Tycko *Science* **2005**, 307, 262.
- [68] D. P. Smith, S. E. Radford *Protein Sci.* **2001**, 10, 1775.
- [69] M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, M. Stefani *Nature* **2002**, 416, 507.
- [70] F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. Serrano *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16, 118.
- [71] C. G. Glabe *Neurobiol. Aging* **2006**, 27, 570.
- [72] C. M. Dobson *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 329.
- [73] M. T. Pastor, N. Kuemmerer, V. Schubert, A. Esteras-Chopo, C. G. Dotti, M. Lopez de la Paz, L. Serrano *J. Mol. Biol.* **2008**, 375, 695.
- [74] D. M. Walsh, B. P. Tseng, R. E. Rydel, M. B. Podlisny, D. J. Selkoe *Biochemistry* **2000**, 39, 10831.
- [75] E. Rogaeva, Y. Meng, J. H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C. T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, F. Chen, N. Shibata, K. L. Lunetta, R. Pardossi-Piquard, C. Bohm, Y. Wakutani, L. A. Cupples, K. T. Cuenco, R. C. Green, L. Pinessi, I. Rainero, S. Sorbi, A. Bruni, R. Duara, R. P. Friedland, R. Inzelberg, W. Hampe, H. Bujo, Y.-Q. Song, O. M. Andersen, T. E. Willnow, N. Graff-Radford, R. C. Petersen, D. Dickson, S. D. Der, P. E. Fraser, G. Schmitt-Ulms, S. Younkin, R. Mayeux, L. A. Farrer, P. St. George-Hyslop *Nat. Genet.* **2006**, 39, 168.
- [76] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, W. L. Klein *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 6448.
- [77] K. N. Dahlgren, A. M. Manelli, W. B. Stine, Jr., L. K. Baker, G. A. Krafft, M. J. LaDu *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 32046.
- [78] D. M. Hartley, D. M. Walsh, C. P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P. M. Vassilev, D. B. Teplow, D. J. Selkoe *J. Neurosci.* **1999**, 19, 8876.
- [79] P. Cleary James, M. Walsh Dominic, J. Hofmeister Jacki, M. Shankar Ganesh, A. Kuskowski Michael, J. Selkoe Dennis, H. Ashe Karen *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 79.
- [80] Y. Du, X. Wei, R. Dodel, N. Sommer, H. Hampel, F. Gao, Z. Ma, L. Zhao, H. Oertel Wolfgang, M. Farlow *Brain* **2003**, 126, 1935.
- [81] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe *Science* **2003**, 300, 486.
- [82] S. Lesne, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. H. Ashe *Nature* **2006**, 440, 352.
- [83] J. I. Kourie, C. L. Henry *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, 29, 741.
- [84] H. A. Lashuel, S. R. LaBrenz, L. Woo, L. C. Serpell, J. W. Kelly *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5262.
- [85] Y. Hirakura, M.-C. Lin, B. L. Kagan *J. Neurosci. Res.* **1999**, 57, 458.
- [86] H. Lin, R. Bhatia, R. Lal *FASEB J.* **2001**, 15, 2433.
- [87] F. Chiti, P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi, C. M. Dobson *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 3590.
- [88] J. D. L. Harper, Peter T., Jr. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 385.
- [89] M. Balbirnie, R. Grothe, D. S. Eisenberg *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 2375.
- [90] B. Caughey, G. S. Baron *Nature* **2006**, 443, 803.

- [91] W. Kim, H. Hecht Michael *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 15824.
- [92] J. Goux Warren, L. Kopplin, D. Nguyen Anh, K. Leak, M. Rutkofsky, D. Shanmuganandam Vasanthi, D. Sharma, H. Inouye, A. Kirschner Daniel *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26868.
- [93] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 460.
- [94] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545.
- [95] L. O. Tjernberg, J. Naslund, J. Thyberg, S. E. Gandy, L. Terenius, C. Nordstedt *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1870.
- [96] M. A. Findeis, G. M. Musso, C. C. Arico-Muendel, H. W. Benjamin, A. M. Hundal, J. J. Lee, J. Chin, M. Kelley, J. Wakefield, N. J. Hayward, S. M. Molineaux *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791.
- [97] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 37.
- [98] D. J. Gordon, K. L. Sciarretta, S. C. Meredith *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237.
- [99] J. J. Balbach, Y. Ishii, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed, R. Tycko *Biochemistry* **2000**, *39*, 13748.
- [100] A.-M. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. Serrano *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1302.
- [101] P. Pawar Amol, F. Dubay Kateri, J. Zurdo, F. Chiti, M. Vendruscolo, M. Dobson Christopher *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 379.
- [102] Y. Kallberg, M. Gustafsson, B. Persson, J. Thyberg, J. Johansson *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12945.
- [103] H. LeVine *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1121.
- [104] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, U. Linne, O. Molt, R. Zadnarm, K. Aschermann, M. Wehner, T. Schrader, D. Riesner *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47497.
- [105] P. Rzepecki, T. Schrader *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3016.
- [106] M. S. Wolfe, W. Xia, C. L. Moore, D. D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I. O. Donkor, D. J. Selkoe *Biochemistry* **1999**, *38*, 4720.
- [107] W. P. Esler, M. S. Wolfe *Science* **2001**, *293*, 1449.
- [108] S. F. Lichtenthaler, D. Beher, H. S. Grimm, R. Wang, M. S. Shearman, C. L. Masters, K. Beyreuther *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 1365.
- [109] X. Cao, T. C. Sudhof *Science* **2001**, *293*, 1436.
- [110] D. Beher, J. D. J. Wrigley, A. P. Owens, M. S. Shearman *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 563.
- [111] C. Esh, L. Patton, W. Kalback, T. A. Kokjohn, J. Lopez, D. Brune, A. J. Newell, T. Beach, D. Schenk, D. Games, S. Paul, K. Bales, B. Ghetti, E. M. Castano, A. E. Roher *Biochemistry* **2005**, *44*, 13807.
- [112] A. Weidemann, S. Eggert, B. M. Reinhard Friedrich, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, L. Masters Colin, K. Beyreuther, G. Evin *Biochemistry* **2002**, *41*, 2825.
- [113] M. S. Wolfe *Biochemistry* **2006**, *45*, 7931.
- [114] B. De Strooper, P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, F. Van Leuven *Nature* **1998**, *391*, 387.
- [115] A. Herreman, L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans, B. De Strooper *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 461.
- [116] S. Naruse, G. Thinakaran, J.-J. Luo, J. W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D. D. Ginty, D. L. Price, D. R. Borchelt, P. C. Wong, S. S. Sisodia *Neuron* **1998**, *21*, 1213.
- [117] Z. Zhang, P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, B. A. Yankner *Nature Cell Biology* **2000**, *2*, 463.
- [118] B. De Strooper *Neuron* **2003**, *38*, 9.

- [119] H. Laudon, E. M. Hansson, K. Melen, A. Bergman, M. R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne, J. Naslund *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 35352.
- [120] G. Yu, F. Chen, M. Nishimura, H. Steiner, A. Tandon, T. Kawarai, S. Arawaka, A. Supala, Y. Q. Song, E. Rogaeva, E. Holmes, D. M. Zhang, P. Milman, P. Fraser, C. Haass, P. St George-Hyslop *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **2000**, 176, 6.
- [121] W. T. Kimberly, W. Xia, T. Rahmati, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3173.
- [122] S. Zhou, H. Zhou, P. J. Walian, B. K. Jap *Biochemistry* **2007**, 46, 2553.
- [123] H. Steiner, E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, C. Haass *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 39062.
- [124] R. Francis, G. McGrath, J. Zhang, D. A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M. C. Ellis, A. L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R. L. Myers, C. S. Himes, R. Hiesch, C. Ruble, J. S. Nye, D. Curtis *Dev. Cell* **2002**, 3, 85.
- [125] C. Goutte, M. Tsunozaki, V. A. Hale, J. R. Priess *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 775.
- [126] W.-J. Luo, H. Wang, H. Li, B. S. Kim, S. Shah, H.-J. Lee, G. Thinakaran, T.-W. Kim, G. Yu, H. Xu *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7850.
- [127] A. Capell, J. Grunberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuthers, D. J. Selkoe, C. Haass *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 3205.
- [128] L.-M. Munter, P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K. E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, G. Multhaup *EMBO Journal* **2007**, 26, 1702.
- [129] S. Zhou, H. Zhou, P. J. Walian, B. K. Jap *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 7499.
- [130] D. M. Walsh, J. V. Fadeeva, M. J. LaVoie, K. Paliga, S. Eggert, W. T. Kimberly, W. Wasco, D. J. Selkoe *Biochemistry* **2003**, 42, 6664.
- [131] T. Mizutani, Y. Taniguchi, T. Aoki, N. Hashimoto, T. Honjo *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 9026.
- [132] M. Okochi, H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, M. Takeda, C. Haass *Embo J.* **2002**, 21, 5408.
- [133] M. T. Saxena, E. H. Schroeter, J. S. Mumm, R. Kopan *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 40268.
- [134] B. D. Strooper, J. Woodgett *Nature* **2003**, 423, 392.
- [135] M. J. LaVoie, D. J. Selkoe *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 34427.
- [136] E. Six, D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel, F. Logeat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 7638.
- [137] H. J. Lee, K. M. Jung, Y. Z. Huang, L. B. Bennett, J. S. Lee, L. Mei, T. W. Kim *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 6318.
- [138] C.-Y. Ni, M. PaulGolde, Todd E. Carpenter, Graham *Science* **2001**, 294, 2179.
- [139] P. Marambaud, J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarnier, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, T. Wisniewski, N. K. Robakis *Embo J.* **2002**, 21, 1948.
- [140] P. Marambaud, H. Wen Paul, A. Dutt, J. Shioi, A. Takashima, R. Siman, K. Robakis Nikolaos *Cell* **2003**, 114, 635.
- [141] P. May, Y. K. Reddy, J. Herz *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 18736.
- [142] S. Lammich, M. Okochi, M. Takeda, C. Kaether, A. Capell, A. K. Zimmer, D. Edbauer, J. Walter, H. Steiner, C. Haass *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 44754.
- [143] I. Okamoto, H. Tsuiki, L. C. Kenyon, A. K. Godwin, D. R. Emlet, M. Holgado-Madruga, I. S. Lanham, C. J. Joynes, K. T. Vo, A. Guha, M. Matsumoto, Y. Ushio, H. Saya, A. J. Wong *Am. J. Path.* **2002**, 160, 441.
- [144] Y. Kim Doo, A. M. Ingano Laura, M. Kovacs Dora *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 49976.

- [145] J. S. Mumm, E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, R. Kopan *Mol. Cell* **2000**, *5*, 197.
- [146] I.-M. Shih, T.-L. Wang *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1879.
- [147] B. K. Hadland, N. R. Manley, D. Su, G. D. Longmore, C. L. Moore, M. S. Wolfe, E. H. Schroeter, R. Kopan *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 7487.
- [148] M. E. Fortini *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 627.
- [149] R. Kopan, M. X. Ilagan *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 499.
- [150] D. Pissarnitski *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2007**, *10*, 392.
- [151] A. Y. Kornilova, C. Das, M. S. Wolfe *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16470.
- [152] A. Weihofen, M. K. Lemberg, E. Friedmann, H. Rueeger, A. Schmitz, P. Paganetti, G. Rovelli, B. Martoglio *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16528.
- [153] M. S. Shearman, D. Beher, E. E. Clarke, H. D. Lewis, T. Harrison, P. Hunt, A. Nadin, A. L. Smith, G. Stevenson, J. L. Castro *Biochemistry* **2000**, *39*, 8698.
- [154] J. E. Audia, T. E. Mabry, J. S. Nissen, S. L. McDaniel, WO9932453, **1999**.
- [155] T. A. Lanz, C. S. Himes, G. Pallante, L. Adams, S. Yamazaki, B. Amore, K. M. Merchant *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 864.
- [156] A. Capell, H. Steiner, M. Willem, H. Kaiser, C. Meyer, J. Walter, S. Lammich, G. Multhaup, C. Haass *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30849.
- [157] A. Geling, H. Steiner, M. Willem, L. Bally-Cuif, C. Haass *EMBO Reports* **2002**, *3*, 688.
- [158] J. L. Castro Pineiro, A. L. Smith, G. I. Stevenson, WO2001066564, **2001**.
- [159] W. P. Esler, W. T. Kimberly, B. L. Ostaszewski, W. Ye, T. S. Diehl, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 2720.
- [160] H. Fuwa, Y. Takahashi, Y. Konno, N. Watanabe, H. Miyashita, M. Sasaki, H. Natsugari, T. Kan, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 408.
- [161] G. T. Wong, D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H.-J. J. Lee, L. Zhang, G. A. Higgins, E. M. Parker *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12876.
- [162] E. Siemers, M. Skinner, R. A. Dean, C. Gonzales, J. Satterwhite, M. Farlow, D. Ness, P. C. May *Clin. Neuropharmacol.* **2005**, *28*, 126.
- [163] E. R. Siemers, J. F. Quinn, J. Kaye, M. R. Farlow, A. Porsteinsson, P. Tariot, P. Zoulnouni, J. E. Galvin, D. M. Holtzman, D. S. Knopman, J. Satterwhite, C. Gonzales, R. A. Dean, P. C. May *Neurology* **2006**, *66*, 602.
- [164] D. Seiffert, J. D. Bradley, C. M. Rominger, D. H. Rominger, F. Yang, J. E. Meredith, Jr., Q. Wang, A. H. Roach, L. A. Thompson, S. M. Spitz, J. N. Higaki, S. R. Prakash, A. P. Combs, R. A. Copeland, S. P. Arneric, P. R. Hartig, D. W. Robertson, B. Cordell, A. M. Stern, R. E. Olson, R. Zaczek *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34086.
- [165] R. C. Zaczek, R. E. Olson, D. A. Seiffert, L. A. Thompson, WO0028331, **2000**.
- [166] G. M. Rishton, D. M. Retz, P. A. Tempest, J. Novotny, S. Kahn, J. J. S. Treanor, J. D. Lile, M. Citron *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2297.
- [167] D. M. Barten, V. L. Guss, J. A. Corsa, A. Loo, S. B. Hansel, M. Zheng, B. Munoz, K. Srinivasan, B. Wang, B. J. Robertson, C. T. Polson, J. Wang, S. B. Roberts, J. P. Hendrick, J. J. Anderson, J. K. Loy, R. Denton, T. A. Verdoorn, D. W. Smith, K. M. Felsenstein *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 635.
- [168] P. C. Belanger, I. J. Collins, J. C. Hannam, T. Harrison, S. J. Lewis, A. Madin, E. G. McIver, A. J. Nadin, J. G. Neduvilil, M. S. Shearman, A. L. Smith, T. J. Sparey, G. I. Stevenson, M. R. Teall, WO0170677, **2001**.
- [169] M. Hendrix, K. Baumann, R. Grosser, G. Koenig, V. Duesterhus, J. Krueger, WO2003059335, **2003**.

- [170] A. Flohr, G. Galley, R. Jakob-Roetne, E. A. Kitas, J.-U. Peters, W. Wostl, WO2005075327, **2005**.
- [171] M. Neitzel, WO2006078753, **2006**.
- [172] A. Flohr, G. Galley, R. Jakob-Roetne, E. A. Kitas, W. Wostl, WO2007020190, **2007**.
- [173] R. E. Olson, C. F. Albright *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8, 17.
- [174] B. Zhao, M. Yu, M. Neitzel, J. Marugg, J. Jagodzinski, M. Lee, K. Hu, D. Schenk, T. Yednock, G. Basi *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 2927.
- [175] B. Greenberg, D. C. Hill, R. Jacobs, S. S. Sisodia, WO2006065218, **2006**.
- [176] J. Netzer William, F. Dou, D. Cai, D. Veach, S. Jean, Y. Li, G. Bornmann William, B. Clarkson, H. Xu, P. Greengard *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 12444.
- [177] P. C. Fraering *J. Biol. Chem.* **2005**.
- [178] S. Cheng, D. D. Comer, L. Mao, G. P. Balow, D. Pleynt, WO 2004110350, **2004**.
- [179] A. Fisher, N. Bar-Ner, Y. Karton, **2003**.
- [180] A. Caccamo, S. Oddo, L. M. Billings, K. N. Green, H. Martinez-Coria, A. Fisher, F. M. LaFerla *Neuron* **2006**, 49, 671.
- [181] B. Schmidt, S. Baumann, R. Narlawar, H. A. Braun, G. Larbig *Neurodegen. Dis* **2006**, 3, 290.
- [182] Y. Laras, G. Quelever, C. Garino, N. Pietrancosta, M. Sheha, F. Bihel, M. S. Wolfe, J.-L. Kraus *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 612.
- [183] M. A. Brodney, K. J. Coffman, E. F. Kleinman, B. T. O'Neill, Y. L. Chen, WO2007034326, **2007**.
- [184] D. Beher, M. Bettati, G. D. Checksfield, I. Churcher, V. A. Doughty, P. J. Oakley, A. Quddus, M. R. Teall, J. D. Wrigley, WO 2005013985, **2005**.
- [185] F. Burkamp, G. D. Checksfield, S. R. Fletcher, S. J. Lewis, E. G. McIver, P. J. Oakley, M. R. Teall, WO2007054739, **2007**.
- [186] P. Blurton, F. Burkamp, I. Churcher, T. Harrison, J. Neduvellil, WO2006008558, **2006**.
- [187] F. Wilson, A. Reid, V. Reader, R. J. Harrison, M. Sunose, R. Hernandez-Perni, J. Major, C. Boussard, K. Smelt, J. Taylor, A. Leformal, A. Cansfield, S. Burckhardt, WO2006045554, **2006**.
- [188] N. Ramsden, F. Wilson, WO2006048219, **2006**.
- [189] R. Narlawar, B. I. Perez Revuelta, K. Baumann, R. Schubanel, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 176.
- [190] D. Pratico, J. Q. Trojanowski *Neurobiol. Aging* **2000**, 21, 441.
- [191] S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrizik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde, E. H. Koo *Nature* **2001**, 414, 212.
- [192] J. L. Eriksen, S. A. Sagi, T. E. Smith, S. Weggen, P. Das, D. C. McLendon, V. V. Ozols, K. W. Jessing, K. H. Zavitz, E. H. Koo, T. E. Golde *J. Clin. Invest.* **2003**, 112, 440.
- [193] T. Kukar, P. Murphy Michael, L. Eriksen Jason, A. Sagi Sarah, S. Weggen, E. Smith Tawnya, T. Ladd, A. Khan Murad, R. Kache, J. Beard, M. Dodson, S. Merit, V. Ozols Victor, Z. Anastasiadis Panos, P. Das, A. Fauq, H. Koo Edward, E. Golde Todd *Nature Med.* **2005**, 11, 545.
- [194] L. Gasparini, L. Rusconi, H. Xu, P. del Soldato, E. Ongini *J. Neurochem.* **2004**, 88, 337.
- [195] Y. Takahashi, I. Hayashi, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, T. Kan, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 18664.
- [196] D. Beher, E. E. Clarke, J. D. J. Wrigley, A. C. L. Martin, A. Nadin, I. Churcher, M. S. Shearman *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 43419.
- [197] T. Morihara, T. Chu, O. Ubeda, W. Beech, G. M. Cole *J. Neurochem.* **2002**, 83, 1009.

- [198] M. Etminan, S. Gill, A. Samii *Brit. Med. J.* **2003**, 327, 128.
- [199] Y. Zhou, Y. Su, B. Li, F. Liu, W. Ryder John, X. Wu, A. Gonzalez-DeWhitt Patricia, V. Gelfanova, E. Hale John, C. May Patrick, M. Paul Steven, B. Ni *Science* **2003**, 302, 1215.
- [200] N. Stock, B. Munoz, J. D. J. Wrigley, M. S. Shearman, D. Beher, J. Peachey, T. L. Williamson, G. Bain, W. Chen, X. Jiang, R. St-Jacques, P. Prasit *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2219.
- [201] G. P. Lim, F. Yang, T. Chu, P. Chen, W. Beech, B. Teter, T. Tran, O. Ubeda, K. H. Ashe, S. A. Frautschy, G. M. Cole *J. Neurosci.* **2000**, 20, 5709.
- [202] J. Rogers, L. C. Kirby, S. R. Hempelman, D. L. Berry, P. L. McGeer, A. W. Kaszniak, J. Zalinski, M. Cofield, L. Mansukhani, P. Willson, *Neurology* **1993**, 43, 1609.
- [203] L. D'Adamio, S. Matsuda, WO2006138355, **2006**.
- [204] T. L. Kukar, T. B. Ladd, M. A. Bann, P. C. Fraering, R. Narlawar, G. M. Maharvi, B. Healy, R. Chapman, A. T. Welzel, R. W. Price, B. Moore, V. Rangachari, B. Cusack, J. Eriksen, K. Jansen-West, C. Verbeeck, D. Yager, C. Eckman, W. Ye, S. Sagi, B. A. Cottrell, J. Torpey, T. L. Rosenberry, A. Fauq, M. S. Wolfe, B. Schmidt, D. M. Walsh, E. H. Koo, T. E. Golde *Nature* **2008**, 453, 925.
- [205] E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 425.
- [206] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R. A. Crowther *Neuron* **1989**, 3, 519.
- [207] A. Andreadis, W. M. Brown, K. S. Kosik *Biochemistry* **1992**, 31, 10626.
- [208] D. W. Cleveland, S.-Y. Hwo, M. W. Kirschner *J. Mol. Biol.* **1977**, 116, 227.
- [209] S. C. Papasozomenos *Lab. Invest.* **1989**, 60, 375.
- [210] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72, 1858.
- [211] J. Biernat, N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Neuron* **1993**, 11, 153.
- [212] H. Braak, E. Braak *Acta Neuropathol.* **1991**, 82, 239.
- [213] A. Ebner, R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek, E. Mandelkow *J. Cell Biol.* **1998**, 143, 777.
- [214] T. Gomez-Isla, R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi, B. T. Hyman *Ann Neurol* **1997**, 41, 17.
- [215] G. Larbig, M. Pickhardt, D. G. Lloyd, B. Schmidt, E. Mandelkow *Curr. Alz. Res.* **2007**, 4, 315.
- [216] M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E.-M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow *Biochemistry* **2007**, 46, 10016.
- [217] B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 9215.
- [218] C. M. Wischik, P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, C. R. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 11213.
- [219] M. Pickhardt, Z. Gazova, M. von Bergen, I. Khlistunova, Y. Wang, A. Hascher, E.-M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 3628.
- [220] R. Narlawar, M. Pickhardt, S. Leuchtenberger, K. Baumann, S. Krause, T. Dyrks, S. Weggen, E. Mandelkow, B. Schmidt *ChemMedChem* **2008**, 3, 165.
- [221] J. Van Wauwe, B. Haefner *Drug News Perspect.* **2003**, 16, 557.
- [222] P. Cohen, M. Goedert *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 479.
- [223] J. Ryder, Y. Su, F. Liu, B. Li, Y. Zhou, B. Ni *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 312, 922.
- [224] C. J. Phiel, C. A. Wilson, V. M. Lee, P. S. Klein *Nature* **2003**, 423, 435.
- [225] T. D. Gould *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, 10, 377.
- [226] X. Liao, L. Zhang, J. B. Thrasher, J. Du, B. Li *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2, 1215.



- [227] G. Wakefield James, J. Stephens David, M. Tavare Jeremy *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 637.
- [228] M. Martin, K. Rehani, S. Jope Richard, M. Michalek Suzanne *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 777.
- [229] S. Frame, D. Zheleva *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, *10*, 429.
- [230] N. Gray, L. Detivaud, C. Doerig, L. Meijer *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 859.
- [231] L. Meijer, S. Leclerc, M. Leost *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 279.
- [232] K. P. Hoeflich, J. Luo, E. A. Rubie, M. S. Tsao, O. Jin, J. R. Woodgett *Nature* **2000**, *406*, 86.
- [233] S. Jope Richard, V. W. Johnson Gail *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 95.
- [234] J. J. Pei, T. Tanaka, Y. C. Tung, E. Braak, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1997**, *56*, 70.
- [235] K. Leroy, A. Boutajangout, M. Authelet, J. R. Woodgett, B. H. Anderton, J.-P. Brion *Acta Neuropath.* **2002**, *103*, 91.
- [236] E. Rockenstein, M. Torrance, A. Adame, M. Mante, P. Bar-on, J. B. Rose, L. Crews, E. Masliah *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 1981.
- [237] L. Meijer, A. M. W. H. Thunnissen, A. W. White, M. Garnier, M. Nikolic, L. H. Tsai, J. Walter, K. E. Cleverley, P. C. Salinas, Y. Z. Wu, J. Biernat, E. M. Mandelkow, S. H. Kim, G. R. Pettit *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51.
- [238] M. P. Coghlan, A. A. Culbert, D. A. E. Cross, S. L. Corcoran, J. W. Yates, N. J. Pearce, O. L. Rausch, G. J. Murphy, P. S. Carter, L. R. Cox, D. Mills, M. J. Brown, D. Haigh, R. W. Ward, D. G. Smith, K. J. Murray, A. D. Reith, J. C. Holder *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 793.
- [239] P. Kozikowski Alan, N. Gaisina Irina, A. Petukhov Pavel, J. Sridhar, T. King LaShaunda, Y. Blond Sylvie, T. Duka, M. Rusnak, A. Sidhu *ChemMedChem* **2006**, *1*, 256.
- [240] P. Mazanetz Michael, M. Fischer Peter *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6*, 464.
- [241] M. Zeng, Y. Jiang, B. Zhang, K. Zheng, N. Zhang, Q. Yu *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 395.
- [242] M. Leost, C. Schultz, A. Link, Y.-Z. Wu, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, C. Kunick, L. Meijer *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5983.
- [243] R. Bhat, Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormo, Y. Nilsson, A.-C. Radesater, E. Jerning, P.-O. Markgren, T. Borgegard, M. Nylof, A. Gimenez-Cassina, F. Hernandez, J. Lucas Jose, J. Diaz-Nido, J. Avila *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45937.
- [244] A. Martinez, M. Alonso, A. Castro, C. Perez, F. J. Moreno *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1292.
- [245] A. Martinez, M. Alonso, A. Castro, I. Dorronsoro, J. L. Gelpi, F. J. Luque, C. Perez, F. J. Moreno *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7103.
- [246] A. S. Wagman, K. W. Johnson, D. E. Bussiere *Curr. Pharm. Design* **2004**, *10*, 1105.
- [247] Z. P. Zhuang, M. P. Kung, C. Hou, D. M. Skovronsky, T. L. Gur, K. Plossl, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, H. F. Kung *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1905.
- [248] W. E. Klunk, Y. Wang, G.-F. Huang, M. L. Debnath, D. P. Holt, C. A. Mathis *Life Sci.* **2001**, *69*, 1471.
- [249] A. Lockhart, J. R. Lamb, T. Osredkar, L. I. Sue, J. N. Joyce, L. Ye, V. Libri, D. Leppert, T. G. Beach *Brain* **2007**, *130*, 2607.
- [250] M.-P. Kung, C. Hou, Z.-P. Zhuang, B. Zhang, D. Skovronsky, J. Q. Trojanowski, M. V. Y. Lee, H. F. Kung *Brain Res.* **2002**, *956*, 202.
- [251] Y. Auberson, WO2003074519, **2003**.
- [252] W. E. Klunk, B. J. Bacskaï, C. A. Mathis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang, B. T. Hyman *J. Neuropath. Exper. Neurol.* **2002**, *61*, 797.

- [253] C. Haass, D. J. Selkoe *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 101.
- [254] R. Fluhrer, G. Grammer, L. Israel, M. M. Condrón, C. Haffner, E. Friedmann, C. Bohland, A. Imhof, B. Martoglio, D. B. Teplow, C. Haass *Nat. Cell Biol.* **2006**, 8, 894.
- [255] A. Weihofen, M. K. Lemberg, H. L. Ploegh, M. Bogoy, B. Martoglio *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 30951.
- [256] N. Bodor, L. Prokai, W. M. Wu, H. Farag, S. Jonalagadda, M. Kawamura, J. Simpkins *Science* **1992**, 257, 1698.
- [257] C. B. Z. Diwu, D. H. Klauber *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4987.
- [258] H. P. H. M. A. D. T. S. Rijkers, H. C. Hemker, G. I. Tesser *Tetrahedron* **1995**, 51, 11235.
- [259] L. Weyrauch, *Examensarbeit TU Darmstadt*, **2006**.
- [260] E. E. Clarke, I. Churcher, S. Ellis, J. D. J. Wrigley, H. D. Lewis, T. Harrison, M. S. Shearman, D. Beher *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 31279.
- [261] G. Yu, F. Chen, M. Nishimura, H. Steiner, A. Tandon, T. Kawai, S. Arawaka, A. Supala, Y. Q. Song, E. Rogaeva, E. Holmes, D. M. Zhang, P. Milman, P. Fraser, C. Haass, P. St George-Hyslop *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **2000**, 176, 6.
- [262] T. Gebel, M. Arand, F. Oesch *FEBS Letters* **1992**, 309, 37.
- [263] T. Kukar, M. P. Murphy, J. L. Eriksen, S. A. Sagi, S. Weggen, T. E. Smith, T. Ladd, M. A. Khan, R. Kache, J. Beard, M. Dodson, S. Merit, V. V. Ozols, P. Z. Anastasiadis, P. Das, A. Fauq, E. H. Koo, T. E. Golde *Nat. Med.* **2005**, 11, 545.
- [264] J. Najib *Clin. Ther.* **2002**, 24, 2022.
- [265] J. Berger, S. Albet, M. Bentejac, A. Netik, A. Holzinger, A. A. Roscher, M. Bugaut, S. Forss-Petter *Eur. J. Biochem.* **1999**, 265, 719.
- [266] R. Narlawar, B. I. PerezRevuelta, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, K. Baumann *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7588.
- [267] R. Narlawar, K. Baumann, R. Schubanel, B. Schmidt *Neurodegener. Dis.* **2007**, 4, 88.
- [268] H. Z. A. Pascual, S. Trah, P. Ertl, T. Winkler *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1381.
- [269] J. Brunner *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 483.
- [270] M. H. T. Bender, H. Wiczorek, S. Grond, P. von Zezschwitz *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 23, 3870.
- [271] M. Lopez de la Paz, L. Serrano *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 87.
- [272] A. Esteras-Chopo, L. Serrano, M. Lopez de la Paz *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 16672.
- [273] M. Lopez De La Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, M. Dobson Christopher, A. Hoenger, L. Serrano *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 16052.
- [274] G. Forloni, L. Colombo, L. Girola, F. Tagliavini, M. Salmona, *FEBS Lett* **2001**, 487, 404.
- [275] R. Csuk, H. Honig, H. Weidmann, H. K. Zimmerman, Jr. *Arch. Pharm.* **1984**, 317, 336.
- [276] T. S. N. Okamura, S. Furumoto, M. Suzuki, H. Shimadzu, H. Akatsu, T. Yamamoto, H. Fujiwara, M. Nemoto, M. Maruyama, H. Arai, K. Yanai, T. Sawada, Y. Kudo *J. Neurosci.* **2005**, 25, 10857.
- [277] L. M. Bierer, P. R. Hof, D. P. Purohit, L. Carlin, J. Schmeidler, K. L. Davis, D. P. Perl *Arch. Neurol.* **1995**, 52, 81.
- [278] E. D. Roberson, K. Scarce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G. Q. Yu, L. Mucke *Science* **2007**, 316, 750.
- [279] R. Narlawar, M. Pickhardt, S. Leuchtenberger, K. Baumann, S. Krause, T. Dyrks, S. Weggen, E. Mandelkow, B. Schmidt *ChemMedChem* **2007**, 3, NA.
- [280] M. Chen, V. O. Ona, M. Li, R. J. Ferrante, K. B. Fink, S. Zhu, J. Bian, L. Guo, L. A. Farrell, S. M. Hersch, W. Hobbs, J. P. Vonsattel, J. H. Cha, R. M. Friedlander *Nat. Med.* **2000**, 6, 797.

- [281] G. Larbig, *Dissertation TU Darmstadt*, **2007**.
- [282] T. Uchihara, A. Nakamura, M. Yamazaki, O. Mori, K. Ikeda, K. Tsuchiya *Acta Neuropathol.* **2001**, 102, 462.
- [283] C. A. W. C. J. Piel, V. M. Lee, P. S. Klein *Nature* **2003**, 423, 435.
- [284] P. K.-C. C. Feyt, K. Leroy, F. N'Kuli, P. J. Courtoy, J. P. Brion, J., N. Octave *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 33220.
- [285] M. P. Mazanetz, P. M. Fischer, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 464.
- [286] J. J. L. Liao *J. Med. Chem.* **2007**.
- [287] M. F. L. Meijer, P. Greengard *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 471.
- [288] R. Bhat, Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormoe, Y. Nilsson, A.-C. Radesaeter, E. Jerning, P.-O. Markgren, T. Borgegard, M. Nyloef, A. Gimenez-Cassina, F. Hernandez, J. J. Lucas, J. Diaz-Nido, J. Avila *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45937.
- [288] C. Goldsbury, P. Frey, V. Olivieri, U. Aebi, S. A. Muller *J. Mol. Biol.* **2005**, 352, 282.
- [290] H.-J. Frohn, N. Y. Adonin, V. V. Bardin, V. F. Starichenko *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2002**, 628, 2827.
- [291] H. J. Karlsson, M. H. Bergqvist, P. Lincoln, G. Westman *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2369.



# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

- Vorname: Stefanie Sabine
- Nachname: Baumann
- Adresse: Ernst-Kachel-Str. 25, 70563 Stuttgart
- Geburtstag/-ort: 07.09.1978, Ulm/Donau

## AUSBILDUNG

---

12/2004 – 08/2008: **Technische Universität Darmstadt**

- Doktorarbeit in Organischer Chemie bei Prof. Boris Schmidt: „*Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen zur Behandlung von Morbus Alzheimer*“.
- Organische Synthese, Design und Untersuchung von Aggregations- und Enzyminhibitoren, Assay-Entwicklung, Medizinalchemie.
- Dozententätigkeit: Übung Organische Chemie für Biologiestudierende, Praktikum für das Höhere und das Berufliche Lehramt, Praktikum Kosmetikchemie.

11/1998 - 11/2004: **Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

- Studium Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien, 1. Staatsexamen (Note: 2,2).
- 01/2003 - 10/2003: Examensarbeit bei Prof. Carsten Schmuck  
„*Entwicklung multivalenter Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren zur Komplexierung polyanionischer Substrate wie Heparin*“ (Note: 1,0).

1989 - 1998: **Gymnasium St. Hildegard Ulm** (math.-nat. Zweig)

- Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,8).

## BERUFSERFAHRUNG und FORSCHUNGSaufenthalte

---

seit 09/2008: **Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.**

- Wissenschaftsredakteurin, Koordination von *SYLETT*, *SYNTHESIS*, *SYNFACTS*.

02/2005 – 03/2005: **European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Heidelberg**

- Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Luis Serrano (Strukturbiologie):  
Aufbau eines *in vitro* Assays für Aggregationsinhibitoren.

## PRAKTIKA und NEBENTÄTIGKEITEN

---

04/2004 – 06/2004: **Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Nachrichten aus der Chemie (Frankfurt)**: Redaktionspraktikum, Verfassen von Beiträgen, Redigieren, Rubrikbetreuung.

02/2003 und 07/2003: **Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

- Betreuung der tierphysiologischen Praktika

## ZUSATZQUALIFIKATIONEN

---

- EDV: MS Office, Scifinder Scholar, ChemOffice, MDL Beilstein Crossfire, MestReC,
- Netzwerkadministration im Arbeitskreis von Prof. Schmidt, TU Darmstadt
- Sprachen: Englisch (fließend), Französisch (gute Kenntnisse)

## WEITERBILDUNG

---

07/2009: OMCOS, Glasgow

05/2009: Tetrahedron Symposium, Paris

2007: Vorlesungsreihe TU Darmstadt: Analytik und Qualitätskontrolle im chemischen und pharmazeutischen Unternehmen.

09/2006: Konferenz *Neurodegenerative Diseases: Molecular Mechanisms in a Functional Genomics Framework*, Berlin: Posterpräsentation

07/2006: Internationale Alzheimerkonferenz *ICAD*, Madrid, Satellitensymposium: Vortrag: *"Tic Taß Tau - A Systematic Approach to Protein Aggregation with Small Molecules"*

## VERÖFFENTLICHUNGEN

---

- S. Baumann *Nachrichten aus der Chemie* **2004**, 52, 783.
- B. Schmidt, S. Baumann, R. Narlawar, H. A. Braun, G. Larbig *Neurodegenerative Diseases* **2006**, 3, 290.
- B. Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6, 377.
- S. Baumann, N. Höttecke, B. Schmidt  *$\gamma$ -Secretase as a Target for AD*, in *Medicinal Chemistry of Alzheimer's Disease*, A. Martinez, Ed.; Research Signpost **2008**.
- N. Höttecke, S. Baumann, A. Taghavi, H. A. Braun, B. Schmidt *Drug Development and Diagnostics for Alzheimer's Disease Up to 2008*, in *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Vol. 4; Atta-ur-Rahman, A.B. Reitz, Eds.; Bentham Books **2009**, 730-766.
- N. Höttecke, S. Baumann *Bioforum* **2009**, 6, 32.
- Stefanie Baumann, Nicole Höttecke, Karlheinz Baumann, Robert Schubengel, Boris Schmidt *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6986.

Stefanie Baumann  
Ernst-Kachel-Str. 25  
70563 Stuttgart

04.09.2009

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Stefanie Baumann  
Ernst-Kachel-Str. 25  
70563 Stuttgart

04.09.2009

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.